C. Werner

1971.

DAS VERTEILUNG GELOSTETER VIBRATIONSENERGIEN
UND IHREN ÜBERGANG INNERHALB VIRALMO

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

Diplomphysiker von
HANS WEBER
aus
Sankt Ingbert

Frankfurt am Main
(1974)

ZUR DARSTELLUNG HALOGENIERTER RIBONUKLEINSÄUREN UND IHRER INTERFERON INDUZIERENDEN WIRKUNG

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

Eingereicht von

CLAUS WERNER

aus

Saarbrücken

Frankfurt am Main

(1971)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

In Dankbarkeit

meiner lieben Frau

Helga

und

unserer Tochter Angela

gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545303_0018

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität
Frankfurt am Main

Dekan : Herr Prof. Dr. H. Oelschläger

1. Gutachter : Herr Prof. Dr. A. Wacker

2. Gutachter : Herr Prof. Dr. H. Fasold

Tag der mündlichen Prüfung : 5.3.1971

I. A B K Ü R Z U N G E N

AMP	=	Adenosinmonophosphat
ADP	=	Adenenosindiphosphat
CMP	=	Cytidinmonophosphat
CDP	=	Cytidindiphosphat
CTP	=	Cytidintriphosphat
DEAE	=	Diäthylaminoäthyl
DNS	=	Desoxyribonukleinsäure
GMP	=	Guanosinmonophosphat
GDP	=	Guanosindiphosphat
Poly A	=	Polyadenylsäure
Poly A:U	=	Polyadenylsäure/Polyuridylsäure (1:1)
Poly Brom-C	=	Poly-5-Bromcytidylsäure
Poly C	=	Polycytidylsäure
Poly I	=	Polyinosinsäure
Poly I:C	=	Polyinosinsäure/Polycytidylsäure (1:1)
Poly Jod-C	=	Poly-5-Jodcytidylsäure
Poly U	=	Polyuridylsäure
RNS	=	Ribonukleinsäure
UDP	=	Uridindiphosphat
UMP	=	Uridinmonophosphat
Upm	=	Umdrehungen pro Minute
UV	=	Ultraviolett

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

A. EINLEITUNG

I. Abkürzungen 1

II. Einführung in die Arbeit 2

III. Spezifische Interferon-Induktion 6

IV. Der Induktionsvorgang und der Schutzeffekt 11

V. Viruserkrankungen: Ein chemotherapeutisches Problem 15

VI. Aufgabenstellung 17

VII. Prinzip und Titerermittlung im Interferon-Test 19

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Darstellung von Polycytidylsäure 22

a) Synthese von Methyl-tri-n-octylamoniumhydroxid 22

b) Gewinnung von Polynukleotidphosphorylase 23

c) Synthese von P_1-Cytidin-5'-P_2-diphenylpyrophosphat 25

d) Synthese von Cytidindiphosphat 27

e) Polymerisierung des Cytidindiphosphates 29

Seite

II. Darstellung von Poly-5-Jodcytidylsäure 31

a) Synthese von 5-Jodcytidinmonophosphat 31

b) Synthese von 5-Jodcytidindiphosphat 33

c) Polymerisation von 5-Jodcytidindiphosphat 34

III. Darstellung von Poly-5-Bromcytidylsäure 35

a) Synthese von 5-Bromcytidinmonophosphat 35

b) Synthese von 5-Bromcytidinphosphatmorpholidat 36

c) Synthese von 5-Bromcytidindiphosphat 38

d) Polymerisation von 5-Bromcytidindiphosphat 41

IV. Bromierung von Hefe-Ribonukleinsäure 44

V. Gewinnung einer tierischen Ribonukleinsäure 48

a) Isolierung eines tierischen Ribonukleoproteins 48

b) Basenanalyse von der Ribonukleinsäure 50

c) Auftrennung des Ribonukleoproteins 52

d) Charakterisierung der Ribonukleinsäure 53

e) Folin-Test auf Protein 55

f) Orcin-Test auf Ribonukleinsäure 56

Seite

VI. Darstellung der Lösungen für den Interferon-Test 57

C. ERGEBNISSE UND DISKUSSION 60

D. ZUSAMMENFASSUNG 69

E. LITERATURVERZEICHNIS 71

A. EINLEITUNG

II. EINFÜHRUNG IN DIE ARBEIT

Es war schon lange bekannt, daß sehr oft die Zucht von zwei verschiedenartigen Viren in einem Zellmedium tierischen Ursprungs nicht vonstatten geht. Die Zugabe einer Virusart zu einer gut gedeihenden Zellkultur, in welcher schon ein anderer Virus wächst, interferierte in diesem Sinne mit letzterem. Dieses Phänomen des sich gegeneinander Aufhebens nennt man Interferenz-Prinzip. Die Natur dieses Geschehens lag für lange Zeit im Dunkel, bis 1957 ISAACS und LINDENMANN (1) hier einen entscheidenden Fortschritt erzielen konnten.

Die Autoren behandelten Stücke der Chorion-Allantois-Membran eines Hühnerembryos mit hitzeinaktivierten Influenza-Viren. Danach wurden die Membranstücke entnommen und in frischem Puffer 24 Std. inkubiert. Die Zugabe von Überstand von diesem Medium zu einer neuen Viruskultur konnte diese wesentlich inaktivieren. Bei der Kontrolle trat keine Virushemmung ein. Der hier verantwortliche Faktor wurde Interferon genannt. Bald danach konnte der Protein-Charakter des Faktors von LINDENMANN,

BURKE und ISAACS (2) festgelegt werden. Sie stützen sich dabei auf folgende Befunde:

a) Der Faktor wird von einer Visking-Cellophan-membrane festgehalten.
b) Er sedimentiert bei einer Zentrifugalkraft von: 100.000 g.
c) Er wird durch gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung präzipitiert.
d) Er wird durch Trypsin zerstört.
e) Er wird durch Ribonukleasen und Desoxyribo-nucleasen nicht angegriffen.

Viele Autoren haben inzwischen gezeigt, daß andere Virus induzierte Interferone sich sehr ähnlich verhalten. Es ist deshalb als sicher anzunehmen, daß der Faktor Interferon wenigstens in einem Teil aus Protein bestehen müßte.
Jedoch meinen NAGANO et. al. (3, 4, 5) auf Grund ihrer Befunde, daß der wirksame Teil des Interferons ein eiweißfreies Oligo- oder Poly-Saccharid sei. Dieses wäre außerhalb der Zellen nur in Zusammenhang mit einem Protein stabil.

Die große Gruppe der bekannten Interferon induzierenden Viren sind die Myxo- und Arbo-Viren. Beide Typen sind Ribonucleinsäure enthaltende (RNS)

Viren. Es sei daran erinnert, daß Viren im wesentlichen aus einer Nukleinsäure-Kette und einer Hülle aus Protein bestehen. Die Myxo- und Arbo-Viren können eine breite Skala von Wirten und Zellen infizieren, besonders Gewebe von Vögeln. Meistens rufen sie im Organismus chronische Infektionen hervor. Die Interferon induzierende Wirkung dieser RNS-Viren ist besonders durch die Untersuchungen von VILCEK (6), SATHER und HAMMON (7) sowie von PARKMAN et al. (8) bekannt geworden.

Auch einige Entero-Viren besitzen eine Interferon induzierende Wirkung. So konnten HO und ENDERS (9) dieses Phänomen bei einem Polio-Virus Typ II nachweisen und weiterhin HEINEBERG et al. (10) bei dem Virus Coxsackie B1. Desgleichen konnte die Induktion bei verschiedenen desoxyribonukleinsäurehaltigen (DNS) Viren nachgewiesen werden. FRUITSTONE et al. (11) konnten dies im Herpes-Simplex-Virus aufzeigen und KHOOBYARIAN (12) in verschiedenen Typen von Adeno-Viren. Aber auch kompliziertere Organismen können die Induktion hervorrufen. So seien der Vollständigkeit halber noch Rickettsien (13), Salmonellen (14), Klebsiellen (15), Listeria monocytogenes (16), Toxoplasma gondii (17) und Mycoplasma pneumoniae (18) genannt.

Im Laufe dieser und anderer Untersuchungen hat sich langsam herauskristallisiert, daß man es bei dem Interferon nicht in jedem Fall mit ein und demselben Stoff gleichen Molekulargewichts, Resistenz gegen verschiedene pH's usw. zu tun hat. Deshalb spricht man heutzutage von verschiedenen Interferonen. Erwähnenswert ist der erste Nachweis des Zelltyps, von welchem beim Menschen in vitro das Interferon abgegeben wird. GRESSER (19) zeigte, daß dies die aus dem Blut isolierten Leukocyten sind. Somit scheint ein Zusammenhang mit der allgemeinen Immunabwehr des Organismus zu bestehen. Später entdeckten JOHNSON und Mac LAREN (20), daß besonders auch menschliche Amnion-Fibroblasten aktivierbar sind.

III. SPEZIFISCHE INTERFERON-INDUKTION

Nach der Entdeckung des Interferons setzten allgemeine Bemühungen ein, definierte Substanzen zu finden, welche auch seine Induktion hervorrufen könnten. Der therapeutische Hinblick ist hierbei einleuchtend. Ein von pathogenen Viren befallener tierischer oder menschlicher Organismus könnte durch die gewollte Auslösung des Interferon-Mechanismus von den schädlichen Folgen befreit werden, vorausgesetzt, die induzierende Verbindung ist weitgehend untoxisch, was die Dosierungsverhältnisse anbelangt.

Erste Schritte in dieser Hinsicht unternahmen 1959 HOOK und WAGNER (21). Sie reinigten das Endotoxin - ein Lipopolysaccharid - des Bakteriums Escherichia coli und spritzten es 1 bis 3 1/2 Std. Mäusen intracerebral, bevor diese mit Influenza-Viren infiziert wurden. Der Effekt des induzierten Interferons war 7 Tage lang zu beobachten. Fünf Jahre später wiederholten STINEBRING und JOUNGNER (15) dieses Experiment unter exakteren Voraussetzungen. Mit 40 mg E. Coli-Endotoxin, i.v. verabreicht, induzierten sie in Küken 2 Std. später einen geringen Interferon-Titer. Sofern sie Mäusen i.v. 250 Microgramm injizierten, konnten sie 2 Std. spä-

ter im Plasma einen Interferon-Titer von 68 feststellen. In einer späteren Veröffentlichung (22) teilen die Autoren mit, daß sie bei weiteren Gaben des Endotoxins an die Versuchstiere, die nach dem ersten Mal einen gewissen Interferon-Spiegel erreicht haben, keine erneute Erhöhung des Titers erreichen konnten. Dies wurde damit erklärt, daß die Versuchsobjekte tolerant geworden sind.

Bei anderen Untersuchungen wollte man sich die bekannte Antibiotika-Wirkung auf Bakterien zunutze machen und griff auf die diesbezüglichen Schimmelpilze zurück. So hatten schon 1952 POWELL et. al. (23) im Filtrat des Penicillium stoloniferum gewisse antivirale Eigenschaften entdeckt. KLEINSCHMIDT und PROBST (24) isolierten dann genauer eine Substanz mit den erwarteten Eigenschaften und nannten sie "Statolon". Es war hauptsächlich ein komplexes anionisches Polysaccharid mit einem hohen Gehalt an Galacturonsäure. Später jedoch meinen ELLIS und KLEINSCHMIDT (25), nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Statolon, daß sich darin virusartige Partikel befänden. Somit könnte diesem Produkt nicht der Charakter einer definierten Verbindung zugesprochen werden.

Vielversprechender war dann die Isolierung des sogenannten "Helenin" aus Penicillium funiculosum durch SHOPE (26,27).LEWIS et. al. (28) charakterisierten es als ein Ribonucleoprotein. Erst viel später haben BANKS et. al. (29) sich diesem Problem neu zugewendet. 1968 veröffentlichten sie eine Arbeit, in welcher sie sich nicht nur mit Helenin, sondern erneut auch mit Statolon befassen. Sie isolieren aus beiden Produkten polyhederähnliche Viruspartikel von 25-20 nm Durchmesser. Sie können nun zeigen, daß die aus diesen Partikeln isolierte RNS doppelsträngig ist. Offensichtlich sind dies drei wesentliche Voraussetzungen für eine optimale Interferon-Induktion: Wichtig wäre zuerst die Nukleinsäure, weiterhin müßte diese den Zucker Ribose beinhalten und drittens müßte ein Doppelstrang vorliegen.

Schon 1963 zeigten ROTEM, COX und ISAACS (30), daß RNS aus Kükenleber das Wachstum von Viren in Mäusezellen-Kulturen inhibieren kann. Umgekehrt kann die aus Mäuseleber isolierte RNS die Vermehrung derselben Viren in Kükenzellen-Kulturen unterbinden. Die RNS einer homologen Spezies, also z.B. Isolierung aus der Maus und Test in Mäusezellen, war dahingegen kaum wirkungsvoll. Offenbar mußte sich die

als Induktor wirkende RNS von der zelleigenen RNS chemisch unterscheiden, um den Interferon-Mechanismus auszulösen.

Unter diesen Gesichtspunkten wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer Nukleinsäure gesucht, welche der Forderung nach Spezies-Heterologität nachkam. Unter den hier angewandten Bedingungen des Interferon-Tests erwies sich eine Hefe-RNS (Fa. Boehringer, Mannheim) als positiv.

Einen wichtigen Impuls auf der Suche nach definierten Verbindungen gaben 1967 HILLEMAN und seine Mitarbeiter (32, 33), als sie aufzeigen konnten, daß eine gewisse synthetische doppelsträngige RNS sich als hervorragender Interferon-Induktor eignet. Es war eine Kombination der Ribopolycytidylsäure (Poly C) mit Ribopolyinosinsäure (Poly I) im Verhältnis 1:1. Die Autoren konnten im Vergleich zu diversen anderen vorher bekannten Interferon-Induktoren (34, 35) aufzeigen, daß Poly I:C noch die Induktion in extrem niedrigen Dosierungen bewirkt, bei welchen die anderen Stoffe längst keinen Effekt mehr erzielen konnten. Bemerkenswert bei diesen Untersuchungen war noch die Tatsache, daß neben dem Doppelstrang aus Poly I und Poly C ein solcher aus Ribopolyadenylsäure und Ribopolyuridinsäure

nur in sehr geringem Umfang eine Wirkung zeigte. Keine positiven Resultate ergab der Einsatz all dieser und anderer synthetischer RNS-Ketten in Einzelstrangform. Als wesentliche Erkenntnisse dieser Arbeiten kann man zwei neue Gesichtspunkte festhalten. Die Nukleinsäure mußte chemisch gesehen spezifisch aufgebaut sein und sie mußte als Doppelstrang vorliegen.

IV. DER INDUKTIONSVORGANG UND DER SCHUTZEFFEKT

Es sei darauf hingewiesen, daß man im Sinne der bisherigen Befunde streng zwischen dem eigentlichen Induktionsvorgang, bzw. der Produktion von Interferon, und dem Schutzeffekt durch diese Substanz bei demselben Zelltyp zu unterscheiden hat. Für beide Vorgänge gibt es trotz intensiver Bemühungen keine schlüssigen Beweise in bezug auf Vorstellungen, welche im vollen Einklang mit den gegebenen molekularbiologischen Erkenntnissen wären. Es sollen jedoch kurz einige Möglichkeiten erörtert werden.

Die erste Frage, die nun aufgeworfen wurde, bezieht sich darauf, ob überhaupt die Interferon induzierende Nukleinsäure in die Zellen eindringt, um dort einen gewissen Mechanismus auszulösen. Als erster hat SCHELL (36) dieses in Frage gestellt. Er zeigt, daß in Tumorzellen vom Typ Ehrlich-Ascites radioaktiv markiertes Poly I:C nach einem Ribonuklease-Waschprozeß viel weniger in den Zellen nachweisbar ist als Poly A:U unter denselben Bedingungen. Der Autor bezieht dies auf den guten Induktionseffekt von Poly I:C und den geringen von Poly A:U, und kommt so zu dem Schluß, daß der vorzügliche Induktor Poly I:C nur zu einem sehr geringen Prozent-

satz von den Zellen aufgenommen wird. Es wird die Hypothese formuliert, daß ein Virus nur Interferon induzieren könne, wenn er an der Zellwand angelagert sei. Das Eindringen in die Zelle und die Vermehrung des Virus in ihr könnte ohne Einfluß auf die Interferon-Induktion sein.

Eingehendst haben sich BAUSEK und MERIGAN (37) mit diesem Problem beschäftigt. Sie können zeigen, daß die Anlagerung von Poly I:C an zwei untersuchten normalen Zelltypen nötig ist, jedoch nicht genügt, um die Interferon-Produktion in Gang zu setzen. Die Autoren setzen dem Induktor außerdem noch DEAE-Dextran zu und weisen nach, daß dieses Polykation die Bindung von Poly I:C an die Zellen wesentlich erhöht. Auf der anderen Seite soll dadurch die Interferon-Induktion nicht erhöht werden. Eher sollte durch das Auftreten von Aggregaten zwischen dem Induktor und dem Dextran die degradierende Wirkung von Ribonuklease aufgehoben werden. Innerhalb der Diskussion neigen die Autoren zu der Annahme, daß zwar relativ viel Poly I:C an eine Zelle gebunden und unter gewissen Umständen sogar aufgenommen wird. Es sei jedoch nur eine geringe Menge innerhalb der Zelle vonnöten, um den Mechanismus auszulösen. Für letztere Annahme sprechen auch die Ver-

suche von HELLER (38) sowie WAGNER und HUANG (39). Sie haben dargelegt, daß für die Ausschüttung des Interferons aus entsprechenden Zellen in diesen vorher eine neue Ribonukleinsäure und auch ein neues Protein gebildet werden mußten. Es findet demgemäß eine de-novo-Synthese statt.

Eine Zwischenstufe wird desgleichen bei der Schutzwirkung des einmal gebildeten und ausgeschütteten Interferons in bezug auf die Hemmung der Virusvermehrung postuliert. Dabei wird davon ausgegangen, daß das Interferon in die noch nicht geschädigten Zellen eindringt. Danach dringt ein pathogenes Viruspartikel in die Zelle ein und nach CARTER und LEVY (40) sowie MARCUS und SALB (41) würde sich folgender Mechanismus entfalten: Ein Protein würde sich an die Ribosomen anlagern und sie an einer bestimmten Stelle soweit verändern, daß dies die Anheftung oder Translation von viraler Messenger-RNS unterbinden würde. Gleichzeitig dürfte diese ribosomale Veränderung keine Beeinträchtigung der Anheftung oder Translation der zelleigenen Messenger-RNS beinhalten. Nach TAYLOR (42) sowie FRIEDMAN und SONNABEND (43) wurde dieses Protein "translation-inhibiting-protein" (TIP) genannt und sein Auftreten soll nicht mit dem von Interferon

identisch sein, sondern gewissermaßen dessen Nachläufer. Besser ausgedrückt, das Interferon würde die Synthese einer speziellen Messenger-RNS bewirken, die wieder dieses Zwischenprotein synthetisiert. JOKLIK und BECKER (44) sowie JOKLIK und MERIGAN (45) meinen, daß die wichtigste Tatsache darin zu suchen sei, daß generell in vitro in Interferon behandelten Zellen es keine Möglichkeiten gäbe, zu den entsprechenden Polyribosomen aus Messenger-RNS und Ribosomen zu gelangen.

V. Viruserkrankungen: ein chemotherapeutisches Problem

Neben dem Krebs existiert noch ein anderes großes volksgesundheitlich wichtiges Problem, nämlich das der Viruserkrankungen. Dies betrifft nicht nur die Humanmedizin, sondern auch die Tierhaltung. Es sei an die verschiedenen Tierseuchen erinnert, die z.T. regelmäßig in der Viehzucht auftreten.

Beim Menschen hat der Kliniker noch kein geeignetes Mittel zur Verfügung, um gezielt gegen eine einmal ausgebrochene Viruserkrankung vorzugehen. Die Situation änderte sich jedoch vor wenigen Jahren grundlegend, als man Induktoren für Interferon fand, die man synthetisch herstellen konnte. Auf die Bedeutung des Interferons ist bereits in den vorhergehenden Abschnitten hingewiesen worden. Ein entscheidender Faktor beeinträchtigt jedoch die Anwendung dieser Interferon-Induktoren, nämlich der Preis.

Wie beschrieben, ist der beste bisher bekannte Induktor das äquimolare Gemisch von Poly Inosinsäure und Poly Cytidylsäure, das die Virusvermehrung 90 - 100 %ig hemmt. Obwohl die Polynukleotidpreise seit Entdeckung dieser Wirkung im Jahre 1967 gesun-

ken sind, beträgt der Grammpreis z.Zt. (Frühjahr 1970) immer noch ca. DM 2.400,-. Für eine Therapie beim Menschen benötigt man 1 mg pro kg Körpergewicht. Eine einmalige Verabreichung genügt jedoch nicht. Bei einer Virusinfektion müßte die Gabe an einen Patienten mehrere Male erfolgen. Somit wären für eine Behandlung DM 1.000,- bis 1.500,- einzusetzen.

Was ist nun der Grund für diesen hohen Preis einer synthetischen Nukleinsäure ? Die Synthese von Poly I oder Poly C verläuft über die Stufen Nucleosidmonophosphat - Nucleosiddiphosphat - Polynukleotid. Die Höhe des Preises spiegelt indirekt die Ausbeute bei einem Syntheseschritt wieder. Während der Preis für ein Nucleosidmonophosphat etwa DM 20,- pro Gramm beträgt, ist die Umwandlung eines Monophosphates in ein Diphosphat nur in geringer Ausbeute möglich, so daß der Preis für das Diphosphat die Hauptrolle bei der Synthese eines Polynukleotids ausmacht. Ein Diphosphat kostet im Durchschnitt etwa pro Gramm DM 250,-. Bei der Umwandlung des Diphosphates in das entsprechende Polynukleotid erhält man eine Ausbeute von etwa 50 %, vorausgesetzt, daß man eine jahrelange Erfahrung bei der Polymerisierung besitzt. Da die Enzymzubereitung eben-

falls nicht einfach und billig ist und sämtliche Reaktionsschritte mit komplizierten physikalischen, chemischen und biologischen Methoden überprüft werden müssen, ergibt sich am Ende der Preis von weit über DM 2.000,- für ein Gramm Poly I oder Poly C.

VI. AUFGABENSTELLUNG

Es sollten einige Substanzen synthetisiert oder isoliert werden, welche dann auf ihre Interferon induzierende Wirkung erprobt werden sollten.

1.) Die Kombination der synthetischen Ribonucleinsäuren Poly C und Poly I hat sich als guter Interferon-Induktor erwiesen.
Hier sollte die chemische Modifizierung, ausgehend von einer Halogenierung, einer dieser RNS-Ketten angestrebt werden. Dazu bot sich der Strang der Polycytidylsäure an. Es mußte ein normaler Strang aus Poly C aufgebaut werden, sowohl als auch zum Unterschied einer aus jodierten und einer aus bromierten Basenbausteinen. Die normale oder halogenierte Polycytidylsäure sollte dann jeweils mit Polyinosin-

säure zu einem Doppelstrang hybridisiert und getestet werden.

2.) Eine natürliche Hefe-RNS sollte bromiert werden, um mögliche Unterschiede zur natürlichen in ihrer Interferon-Wirkung festzustellen.

3.) Isolierung eines tierischen Nucleoproteins. Das Produkt sollte dann in seine Bestandteile zerlegt werden und die RNS-Komponente auf Interferon-Induktion untersucht werden.

VII. PRINZIP UND TITER-ERMITTLUNG IM INTERFERON-TEST

Der Test ist auf zwei Teilschritten aufgebaut. Der erste Schritt befaßt sich mit der Zucht von Zellen eines Säugetieres in einem geeigneten Medium unter streng aseptischen Bedingungen, zu welchem dann der Interferon-Induktor hinzugegeben wird. Nach einer entsprechenden Bebrütungszeit muß dann die Menge des induzierten Interferons erfaßt werden. Hierfür gibt es verschiedene Methoden (FINTER)(46). Jede Methode hat wiederum ihre eigenen Vor- und Nachteile, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll. Gute Erfahrungen wurden mit dem von HO und ENDERS (47) eingeführten Verfahren gemacht. Die diversen Aspekte der Methode wurden zuerst genauer von SELLERS und FITZPATRICK (48) untersucht. In unserem Institut wurde auf das detailliert von BORECKY und LACKOVIC (49) beschriebene Verfahren zurückgegriffen.

Der eigentliche Test wird als "viraler cytopathogener Effekt" bezeichnet. Es kommt darauf an, Viren auf Säugerzellen einwirken zu lassen, bis letztere lysiert sind. Bei bestimmten standardisierten Konzentrationsverhältnissen werden nach wiederum entsprechender Inkubationszeiten ohne Zugabe des

vorher induzierten Interferons eine komplette Lysis der Zellen erreicht, was leicht unter kleiner Vergrößerung im Mikroskop feststellbar ist. Bei Zugabe von Aliquoten einer diesbezüglichen Verdünnungsreihe von vorher induziertem Interferon kann dann festgestellt werden, bei welcher Verdünnung der Virus die Zellen wieder lysieren kann. In der vorhergehenden Reihe, wo dieser cytophatogene Effekt nicht auftritt, ist demnach in steigender Konzentration Interferon als Inaktivator der Viruswirkung vorhanden.

Hier wurden Peritonealzellen der Maus gewonnen und unter Zuhilfenahme einer Bücherkammer auf 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Zu dieser Lösung wurde jeweils der steril gefilterte Induktor, gelöst in 0,01 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,2 und 0,15 M Natriumchlorid, in einer Konzentration von 1 mg/ml dazu gegeben. Sofern es sich um Poly C, Poly Jod-C oder Poly Brom-C handelte, wurden in diesem Puffer je 0,5 mg dieser Substanzen und 0,5 mg Poly I (Fa. Boehringer, Mannheim) gelöst. Unter diesen Bedingungen werden entsprechende hybridisierte Doppelstränge ausgebildet. Als Endkonzentration in dem Test wurden 100 Microgramm in der Induktions-Lösung eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von

24 Std. wurde eine Verdünnungsreihe von je 1 ml, angefangen von 1:2 bis 1:128, aufgestellt.

Im eigentlichen Virustest wurde dann eine diesbezügliche Anzahl von Reagenzgläsern vorbereitet. In jedes wurde dieselbe Menge an Fibroblastenzellen der Maus in einer Verdünnung von 1×10^5 pro ml pipettiert und die hundertfache Menge Virus hinzugefügt, die imstande ist, innerhalb von 24 Std. 50 % dieser Zellen zu lysieren (100 TCD 50). Der hier benutzte mauspathogene Virus trägt die Bezeichnung EMC (Encephalomyocarditis). Zu dem frisch zubereiteten Gemisch an Fibroblasten und Viren wurde jeweils 0,1 ml der oben genannten Verdünnungsreihe hinzugegeben und 24 Std. bebrütet. Sofern am Anfang der Verdünnungsreihe jetzt noch nicht lysierte Zellen zu sehen waren, war die Interferon-Induktion positiv. Danach wurde das Reagenzglas ermittelt, in welchem das erste starke Verschwinden der ursprünglichen Anzahl von Fibroblasten-Zellen festzustellen war. Nach der ursprünglichen Verdünnung des Interferons wurde diejenige als entsprechender Interferon-Titer der getesteten Substanz angegeben, wie z.B. 20 entspricht der Verdünnung 1:20, 64 entspricht 1:64.

Die Interferon-Tests sollten nicht im Rahmen dieser Arbeit ausgeführt werden. Für ihre Durchführung danke ich Frau H. Feller.

B. E X P E R I M E N T E L L E R T E I L

I. DARSTELLUNG VON POLYCYTIDYLSÄURE

Die Synthese erfolgte ausgehend von 5' - Cytidinmonophosphat in Form des Dinatriumsalzes (Fa. Boehringer und Söhne, Mannheim). Alle anderen Reagenzien, wie generell in dieser Arbeit und soweit nicht anders angegeben, stammen von der Fa. E. Merck, Darmstadt. Bei allen Arbeiten mit organischen Lösungsmitteln ist es wichtig, diese nur gut wasserfrei zu verwenden. Für die Aufnahme von Spektren im Ultraviolett-Bereich wurde ein Zeiss-Spektrophotometer PMQ 2 benutzt. Der hier beschrittene Weg der Polycytidylsäure-Synthese war zuerst von MICHELSON (50) entwickelt worden.

a) Synthese von Methyl-tri-n-octylammoniumhydroxid

Hierzu wurde auf LETTRES und MICHELSON (51) zurückgegriffen. Zu 6 ml Tri-n-octylamin werden 6 ml Methyljodid dazugegeben. Zweieinhalb Stunden wird am Rückflußkühler im Dunkeln gekocht. Der Überschuß an Methyljodid wird vorsichtig am Rotationsverdampfer abgezogen, bis die Flüssigkeit zu einer Art kristallinen Masse erstarrt. Letztere

wird anschließend in 20 ml Methanol gelöst und 10 g Silberoxid hinzugefügt. Zwei Stunden wird kräftig geschüttelt und dann abfiltriert. Das Filtrat kann dann so zur Verwendung kommen. Zur Berechnung der Ausbeute (um 40 %) wurde eine normale Titration mit Salzsäure vorgenommen.

b) Gewinnung von Polynukleotidphosphorylase

Die Isolierung des Enzyms erfolgte in Anlehnung an STEINER und BEERS (52). 10 g getrocknete Zellen der Art Micrococcus Lysodeikticus (Fa. Miles, Elkhart, Indiana, USA) werden in 100 ml 0,5 %igem Natriumchlorid suspendiert und mit 1 N Natriumhydroxyd auf pH 7,6 eingestellt. Im Wasserbad wird auf 37° C erwärmt. Dazu wird eine Lösung von 25 mg Lysozym (Fa. Serva, Heidelberg) in 1 ml Wasser gegeben. Es wird während ca. 15 Minuten langsam gerührt, bis sich das Aussehen von geronnener Milch einstellt. Daraufhin wird 50 ml gesättigte und eiskalte Ammoniumsulfat-Lösung dazugegeben, umgerührt und 10 Minuten im Eisbad stehen gelassen. Das nicht gelöste Material wird in einer Serval-Zentrifuge während 30 Minuten und bei 18.000 Upm vom bräunlichen Überstand getrennt. Zu letzterem wird das gleiche Volumen

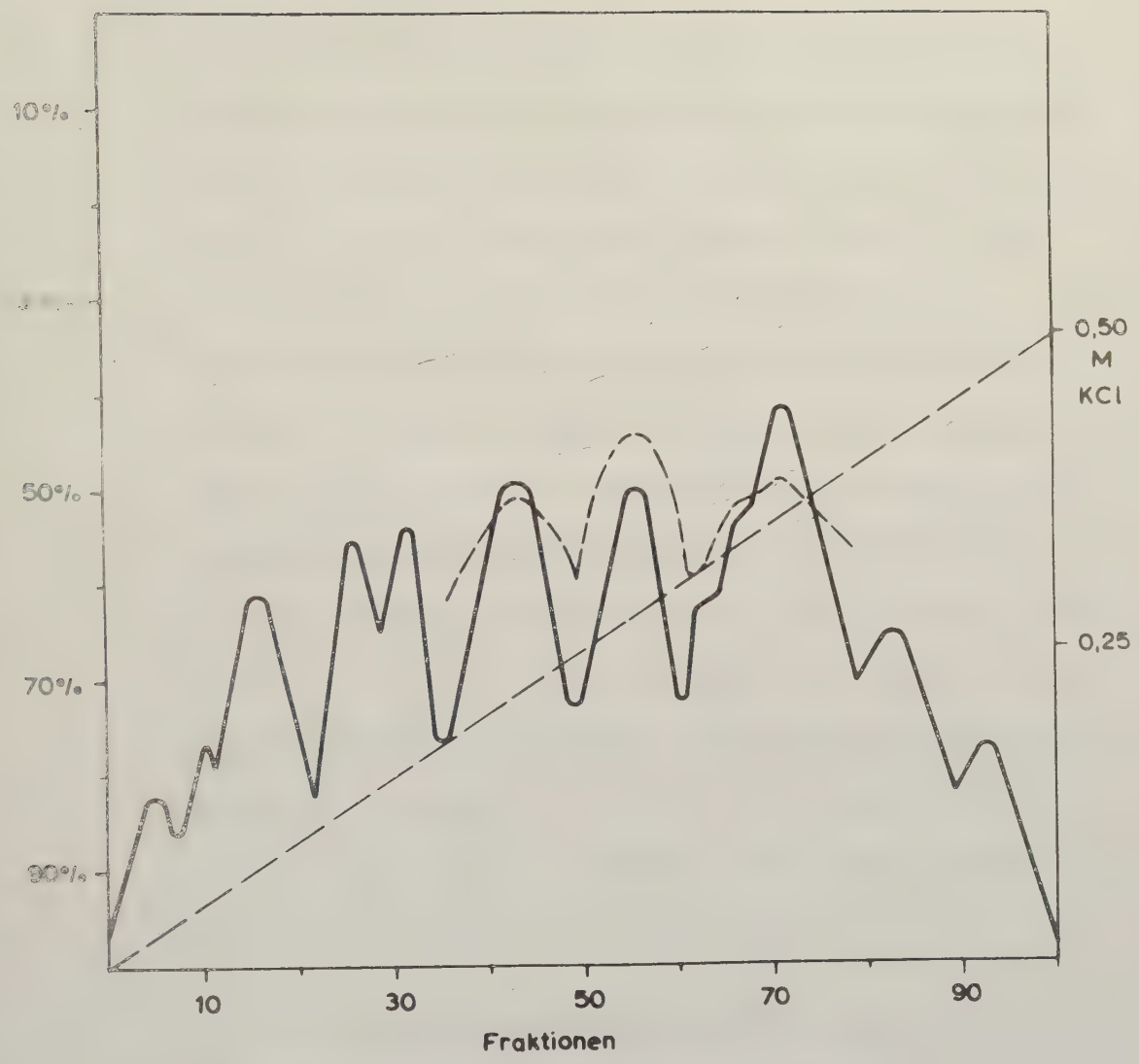


Abb.1:

Reinigung von Polynucleotid-Phosphorylase über DEAE-Zellulose.

Linke Ordinate: Durchlässigkeit bei 257 nm (durchgezogene Linie) und 280 nm (gestrichelte Linie)

Rechte Ordinate: Linearer KCL-Gradient (0,01 M Tris-HCl pH 7,6)

einer wässrigen Lösung von gesättigtem und eiskaltem Ammoniumsulfat hinzugegeben. Das Präzipitat wird abzentrifugiert (30 Min. bei 18.000 Upm) und in 7 ml 0,1 M Tris-HCl pH 7,6 gelöst. Über Nacht wird es gegen 0,01 M Tris-HCl pH 7,6 dialysiert. Die Protein-Lösung muß anschließend auf ca. 10 mg/ml verdünnt werden. Zu je 100 ml werden 24,4 g festes Ammoniumsulfat hinzugefügt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert (30 Min. bei 18.000 Upm) und verworfen. Zum Überstand kommen je 100 ml 8,6 g festes Ammoniumsulfat hinzu. Das Präzipitat wird wieder durch Zentrifugation abgetrennt und in 3 - 4 ml 0,01 M Tris-HCl pH 7,6 gelöst. Eine Dialyse erfolgt über Nacht gegen den gleichen Puffer im Kühlraum.

Es folgt eine Reinigung über eine Säule aus DEAE-Zellulose (Fa. Serva, Heidelberg) 0, (20 x 1,8 cm) im Kühlraum. Die Säule wird mit 0,01 M Tris-HCl pH 7,6 äquilibriert, das Dialysat aufgegeben und mit 100 ml Puffer gewaschen. Das Enzym wird mit einem linearen Gradienten von 200 ml Puffer und 200 ml 0,5 M Kaliumchlorid in Puffer eluiert. Fraktionen von 4 ml werden gesammelt und diese dann durch ihre UV-Absorption bei 280 nm charakterisiert (Abb. 1).

Ein größerer Peak bei ca. 0,25 M Kaliumchlorid wird vereinigt und 50,7 g festes Ammoniumsulfat wird pro 100 ml hinzugefügt. Der Niederschlag wird am nächsten Tag nach Stehen in der Kälte abzentrifugiert (30 Min. bei 16.000 Upm). Er wird in 5 ml 0,01 M Tris-HCl pH 7,6 gelöst und gegen Puffer dialysiert. Die Lösung verliert, eingefroren bei -10° C, mindestens ein halbes Jahr lang praktisch nicht an Aktivität.

c) Synthese von P_1-Cytidin-5'-P_2-diphenylpyrophosphat

340 mg Na2-CMP wird in 20 ml Wasser gelöst und in zwei Portionen über eine Säule (40 x 1,5 cm) des Kationenaustauschers Amberlite IRC 50 (Fa. Serva, Heidelberg) in der H'-Form gegeben. Es wird mit Wasser gewaschen, bis die Extinktion bei 285 nm kein CMP mehr anzeigt und dann am Rotationsverdampfer eingedampft. Reste von Feuchtigkeit werden zweimal mit Methanol abgezogen. Das Material wird in 20 ml Methanol aufgenommen und bei Rühren so lange Methyl-tri-n-octylammoniumhydroxid zugetropft, bis sich alles gut gelöst hat. Anschließend wird das Methanol abgedampft, es bleibt eine glasige Masse zurück. Sie wird in Dioxan aufgenommen und wieder abgezogen. Der

Rückstand wird in 6 ml Dimethylformamid und 10 ml Dioxan gelöst. Dann wird 0,6 ml Phosphorchloridsäure-diphenylester zugesetzt, sogleich umgeschwenkt und sofort anschließend 0,62 ml Tri-n-butylamin hinzugefügt. Der Kolben wird dann gut verschlossen 4 Std. im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird abgezogen und 40 ml Äther zugesetzt, wobei die Substanz weiß ausfällt. Es wird gut umgeschwenkt und eine halbe Stunde bei 4° C stehen gelassen. Der Äther wird weitestgehend abdekantiert und der Rest abgedampft. Als Sirup bleibt das P_1-Cytidin-5'-P_2-diphenylpyrophosphat zurück. Es wird gut verschlossen aufbewahrt.
Ausbeute: 77 %.

Die Kontrolle dieser Substanz wird mittels aufsteigender Chromatographie auf Papier Schleicher und Schüll Nr. 2043 b über Nacht durchgeführt. Als Fließmittel dient ein Gemisch von 2 Volumen 1 M Ammoniumacetat und 5 Volumen Äthanol. Der Stoff weist einen Rf-Wert von 0,77 auf (CMP: 0,17). Die Sichtbarmachung der Flecken erfolgt mittels einer UV-Lampe.

d) Synthese von Cytidindiphosphat.

Dem unter c) erhaltenen Sirup werden 7 ml Pyridin zugesetzt, in welchem 4,5 m Mol Tri-n-butylammoniumphosphat gelöst sind. Die Darstellung des letzteren erfolgt so, daß zu einem Volumen 85 %iger Phosphorsäure zwei Volumen Tri-n-butylamin zugegeben werden und alles in Pyridin gelöst wird. In diesem Verhältnis wird eine optimale Löslichkeit erreicht. Wasserfreiheit wird durch mehrmaliges Abdampfen mit trockenem Pyridin erreicht.

Der gelöste Sirup bleibt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Dann wird das Pyridin weitestgehend bei 30° C unter Zuhilfenahme einer elektrischen Vakuumpumpe abgezogen. Der Rückstand wird in 10 ml Äthanol-Wasser (1:1 Vol.) gelöst. Der pH beträgt ca. 4. Nach zwei Stunden stellt sich ein pH von ca. 6 ein. Dieser wird dann durch Zusetzen von 0,5 N Salzsäure auf pH 2,5 - 3 gebracht und 25 ml Äthanol hinzugefügt. Das Pyrophosphat wird mit 4 ml Äthanol ausgefällt, das mit Calciumchlorid gesättigt ist. Anschließend wird 10 Minuten bei 7.000 Umdrehungen abzentrifugiert und das Präzipitat so gut wie möglich in 20 ml Wasser gelöst.

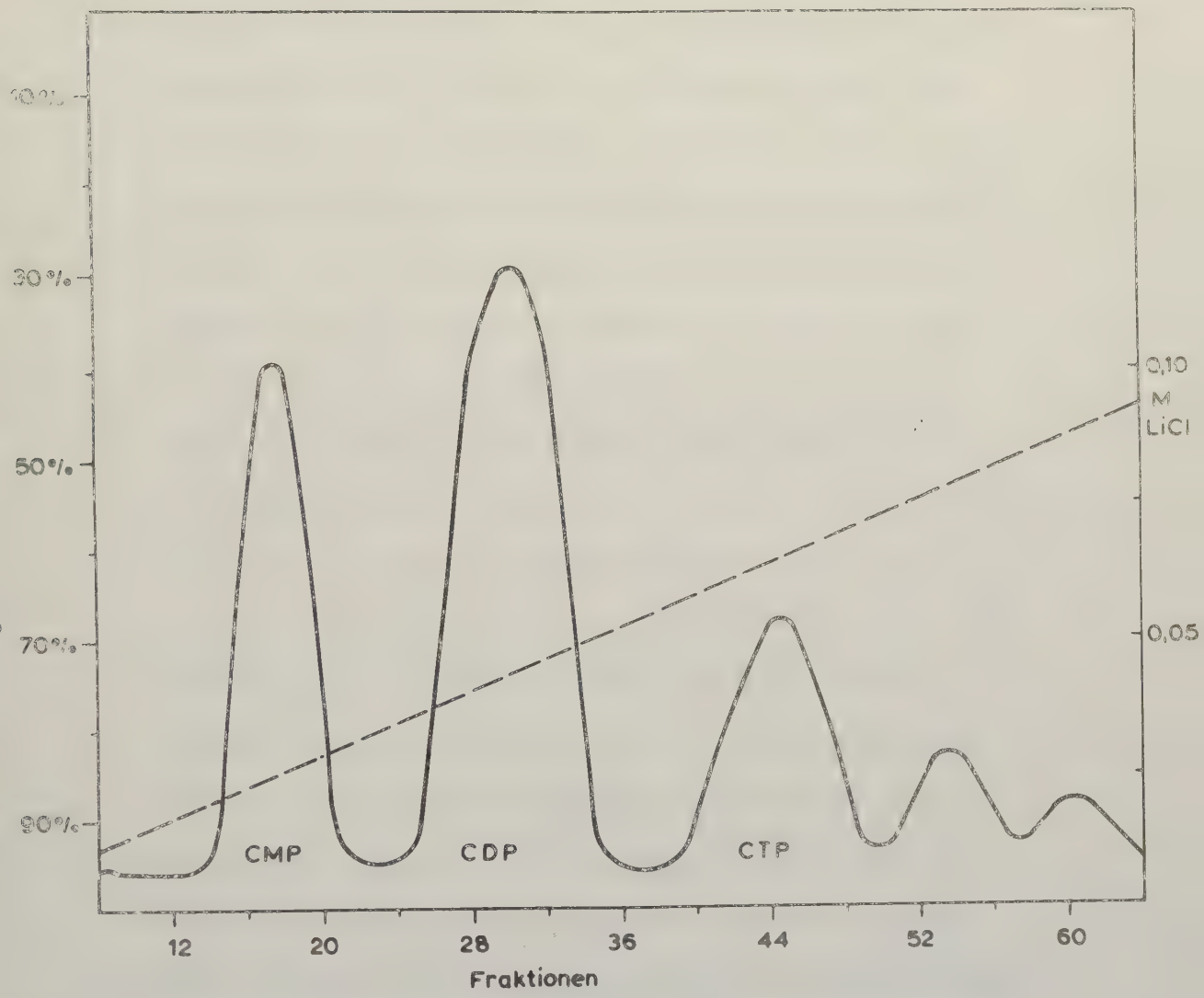


Abb.2:

Abtrennung von Cytidinphosphat über Dowex 1 x 2 mittels eines linearen LiCl-Gradienten (0,005 - 0,05 N HCl).

Die Trennung des Produkts erfolgt über eine Dowex-Säule (20 x 1,5 cm) in der Chlorid-Form (Dowex 1 x 2 der Fa. Serva, Heidelberg). Die gelöste Substanz wird auf die Säule gegeben und diese so lange mit Wasser gewaschen, bis die UV-Absorption eines zugeschalteten Uvicord-Gerätes bei 257 nm auf seine Ausgangsposition zurückgegangen ist. Die Elution erfolgt mittels eines linearen Salzsäure-Lithiumchlorid-Gradienten (500 ml 0,005 N HCl und 500 ml HCl mit 0,1 M LiCl). Es werden Fraktionen von je 15 ml gesammelt. Es erscheinen verschiedene Peaks (Abb. 2). Die Elutionsfraktionen Nr. 23 bis 36 werden vereint und mit Tri-n-butylamin neutralisiert. Anschließend wird bei ca. 30° C unter Zuhilfenahme einer Vakuum-Pumpe bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit 30 ml wasserfreiem Methanol behandelt. Dazu werden 60 ml wasserfreier Äther gegeben, um das reine Lithium-Cytidindiphosphat auszufällen. Es wird bei 5000 Umdrehungen 20 Minuten abzentrifugiert, nochmals mit Äther gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 32 %.

Die Reinheit des Cytidindiphosphates wird mittels Papier-Electrophorese bei pH 3,5 geprüft.

Puffer: 2,26 ml konz. Ameisensäure und 2 ml konz. Ammoniak auf 1 l mit Wasser auffüllen. Spannung 55 V/cm (80mA), Laufzeit 2 Std. Unter diesen Bedingungen bleibt Cytidinmonophosphat an der Startlinie liegen. CDP läuft anodisch 12 cm, die Flecken werden mittels einer UV-Lampe sichtbar gemacht.

UV-Absorptionsdaten:

pH 2: λ_{max} = 280 nm λ_{min} = 241 nm

pH 7: λ_{max} = 271 nm λ_{min} = 249 nm

e) Polymerisierung des Cytidindiphosphats

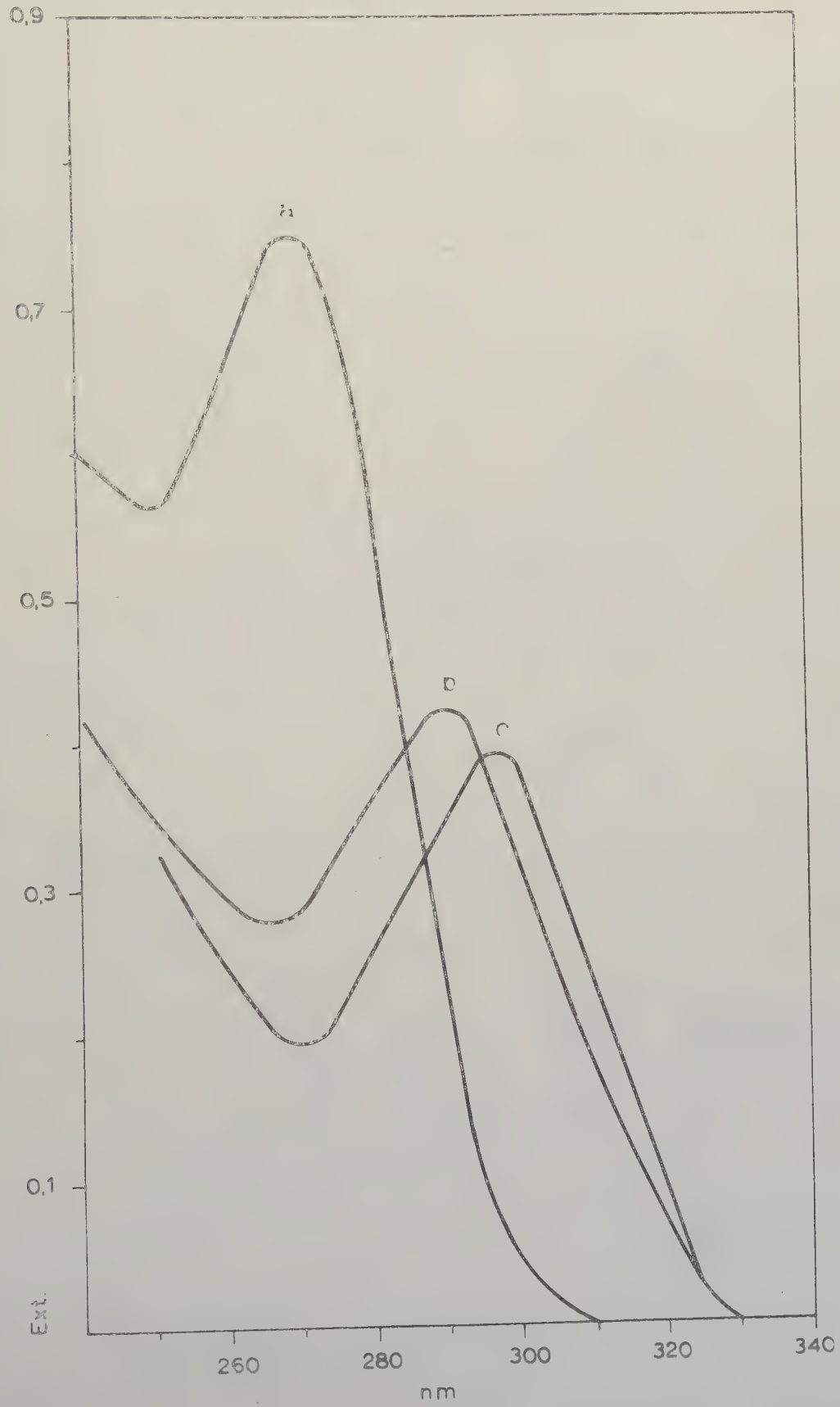
50 mg CDP werden in 1,25 ml Wasser gelöst, dazu kommen in derselben Reihenfolge 0,15 ml 0,01 M Magnesiumchlorid; 0,40 ml 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 9,5 und 0,20 ml Enzym. Diese Lösung wird in eine 2 ml fassende Osswald-Viskosimeter gefüllt und in einem Wasserbad bei 37° C inkubiert. Die Viskositätsmessungen werden der Einfachheit halber in den Zeiten ausgedrückt, die die hochgezogene Lösung braucht, um von einer zur anderen Marke des Instrumentes zurückzufließen. Die anfängliche Durchlaufzeit von einer halben Minute steigert sich dann nach einigen Stunden Inkubationszeit bis zu einer halben Stunde. Die

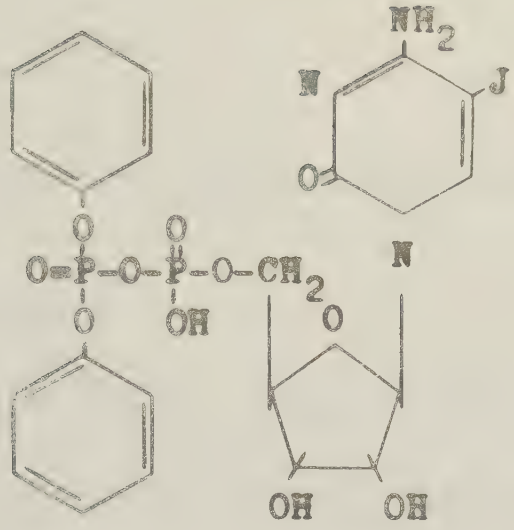
erreichte Viskosität hängt nach HARVEY et. al. (53) von der Enzym-Konzentration und von den Magnesium-Ionen ab.

Wenn der Anstieg der Viskosität zum Stillstand gekommen ist, kommen zu den 2 ml Ansatz 0,33 ml 3 M Kaliumchlorid und 0,023 ml 0,1 M Äthylendiamintetraacetat ("Titriplex III") sowie 5 ml Äthanol, um das Polymere zu präzipitieren. Es wird in einer Tischzentrifuge gesammelt. Der Niederschlag wird in 5 ml 0,5 M Kaliumchlorid gelöst, dem 0,001 M Titriplex zugesetzt ist. Mit einem Glasstab wird so viel wie möglich in Lösung gebracht und gut mit 5 ml Chloroform ausgeschüttelt, um das Enzym zu denaturieren. Es wird wieder zentrifugiert und die klare wässrige Phase vorsichtig abgehoben. Der gesamte Vorgang wird so lange wiederholt, bis bei dem Ausschütteln mit Chloroform kein Präzipitat mehr entsteht. Die wässrige Phase wird anschließend 2 Tage im Kühlraum gegen Wasser dialysiert. Zuletzt wird gefriergetrocknet.
Die Ausbeute liegt bei 47 % weiße, flockige Substanz.

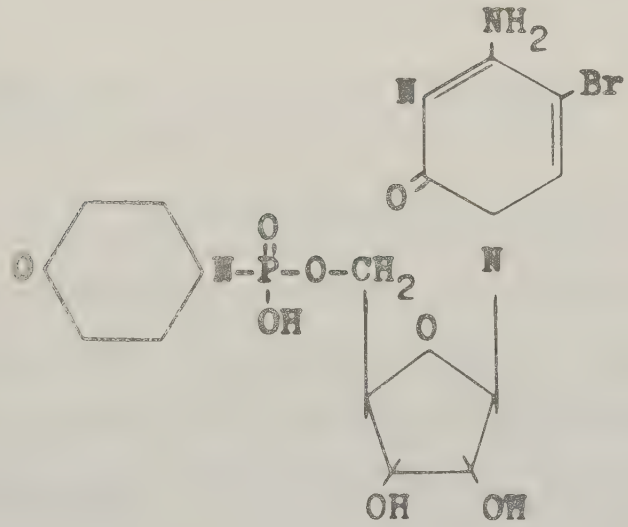
Abb. 2:

UV-Spektren von Polycytidylsäure (a), Poly 5-Bromcytidylsäure (b) und Poly 5-Jodcytidylsäure (c) (o,o1 M Natriumphosphat pH 7).

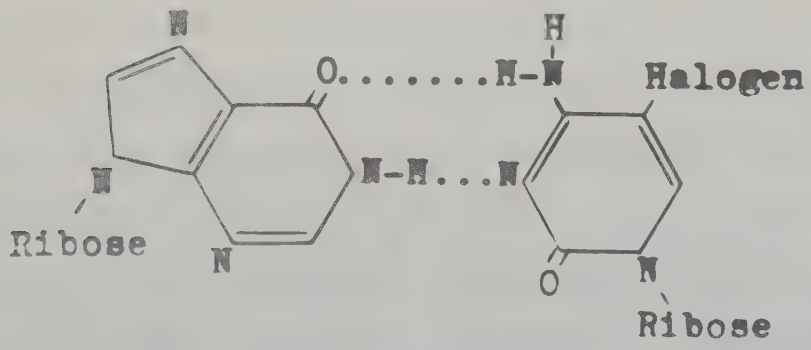




a) P_1-5-Jodcytidin-5'-P_2-diphenylpyrophosphat



b) 5-Bromcytidin-5'-phosphat-morpholidat



c) Basenpaarung zwischen Poly Inosinsäure und Poly 5-Halogencytidylsäure

Zur Charakterisierung von Poly C dient das UV-Spektrum (Abb. 3).

UV-Absorptionsdaten:

pH 2: λ_{max} = 279 nm λ_{min} = 243 nm

pH 7: λ_{max} = 268 nm λ_{min} = 249 nm

II. DARSTELLUNG VON POLY-5-JODCYTIDYLSÄURE

Hier wird von dem halogenierten Jodcytidinmonophosphat ausgegangen und dann analog zur Synthese von Polycytidylsäure vorgegangen, nämlich über die Zwischenstufen P_1-Jod-5'-P_2-Diphenylpyrophosphat und Jodcytidindiphosphat. (Formelschema in Abb. 4a)

a) Synthese von 5-Jodcytidinmonophosphat

600 mg Dinatrium-5'-Cytidinmonophosphat (Fa. Boehringer u. Söhne, Mannheim) werden in 6 ml 1 M Salpetersäure gelöst. Sofort anschließend werden unter Rühren 6 ml Dioxan zugesetzt. Zu dem Gemisch kommen 550 mg Jod und 530 mg Jodtrichlorid. Die Reaktion wird durch Erhitzen in einem Wasserbad auf 87° C, 40 Minuten, erreicht.

Danach wird im Rotationsverdampfer abgezogen. Zum Rückstand kommen 12 ml Äthanol, es wird gut verrieben und abgezogen. Dieses wird wiederholt. Anschließend werden 15 ml Äther zugegeben und dieser dann abdekantiert. Der trockene Rückstand wird in 2 ml warmen Wasser gelöst. Dazu werden langsam 45 ml heißes Äthanol gegeben und ohne Schütteln 3 - 4 Stunden bei 4° C gehalten. Anschließend wird das ausgefallene Material durch Abdekantieren gewonnen. Es wird noch einmal in 2 ml warmen Wasser gelöst und der Reinigungsschritt wiederholt.
Ausbeute: 64 %. Das Produkt ist hygroskopisch.

Die Differenzierung des Produktes von 5'-CMP kann mittels Papier-Electrophorese und Aufnahme des UV-Spektrums durchgeführt werden. Bedingungen der Electrophorese: Papier Schleicher und Schüll Nr. 2043 b; Puffer 0,05 M Tris-HCl pH 9; Spannung 55 V/cm (50 mA); Laufzeit 1 Std. Dabei wandert Jod-CMP anodisch 9 cm, während CMP nur 6 cm erreicht.

UV-Absorptionsdaten:

pH 2: λ_{max} = 309 nm λ_{min} = 264 nm

pH 7: λ_{max} = 293 nm λ_{min} = 262 nm

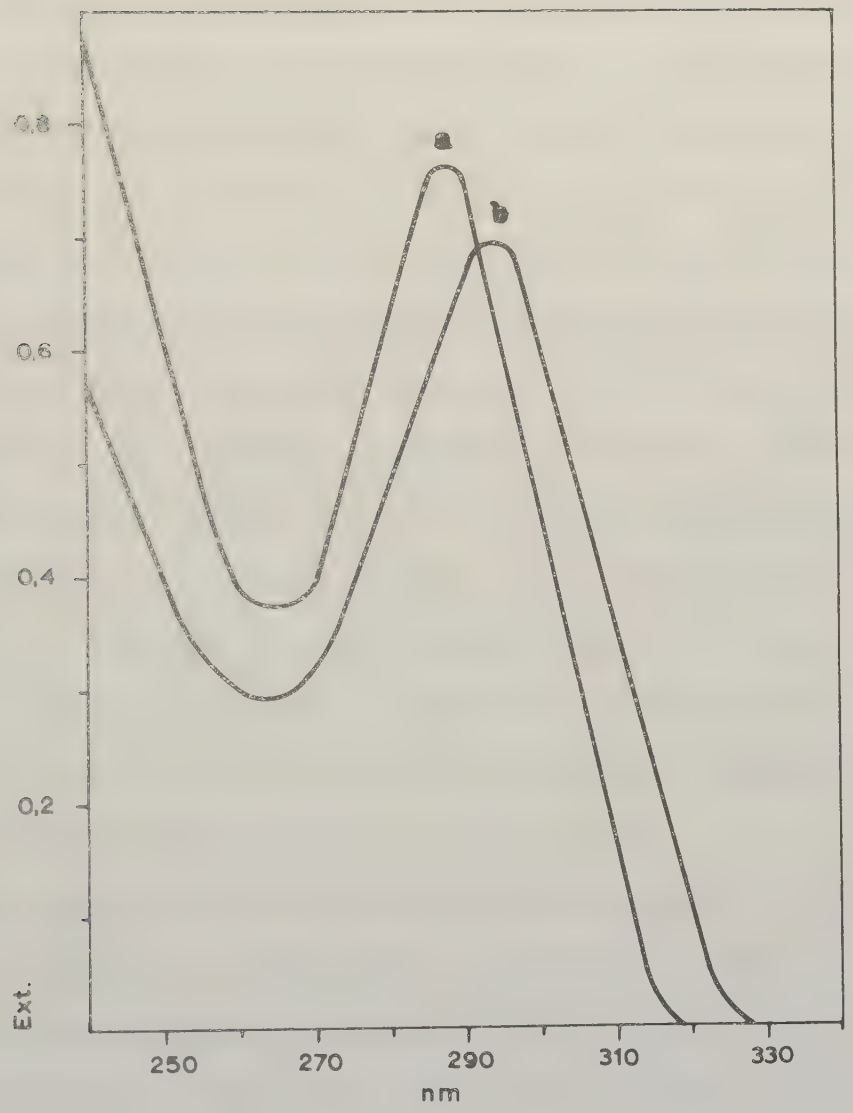


Abb. 5:

UV-Spektren von
5-Bromcytidindiphosphat (a) und
5-Jodcytidindiphosphat (b)

(0,01 M Natriumphosphat pH 7).

b) Synthese von 5-Jodcytidindiphosphat

Das Jodcytidinmonophosphat wird mit wasserfreiem Methanol versetzt und abgezogen. Dieses wird zweimal wiederholt und zuletzt in 20 ml Methanol aufgenommen. Bei Rühren wird so lange Methyltri-n-octylammoniumhydroxid (Synthese unter Abschnitt Ia) zugesetzt, bis sich ein pH von 8 - 9 einstellt. Sollte sich nicht alles gelöst haben, wird unter Erwärmung gerührt. Das Methanol wird am Rotationsverdampfer abgezogen. Der beigefarbenen Gallerte wird Dioxan zugesetzt und wieder abgezogen. Anschließend wird sie in 5 ml Dimethylformamid und 11 ml Dioxan gelöst. Zur Lösung werden 0,75 ml Phosphorchloridsäurediphenylester und 0,8 ml Tri-n-butylamin zugesetzt. Die weiteren Umsetzungen erfolgen in Parallelität zur Darstellung von Cytidindiphosphat (Abschnitt Id).
Zum P_1-Jodcytidin-P_2-diphenylpyrophosphat werden 8 ml Pyridin hinzugefügt, in welchem 5 mMol Tri-n-butylammoniumphosphat gelöst sind. Jodcytidindiphosphat wird als weißes Pulver erhalten. Ausbeute: 27 %.

UV-Absorptionsdaten (siehe auch Abb. 5):

pH 2: λ_{max} = 309 nm λ_{min} = 259 nm

pH 7: λ_{max} = 296 nm λ_{min} = 263 nm

c) Polymerisation von 5-Jodcytidindiphosphat

30 mg Jod-CDP werden in 1,20 ml Wasser gelöst. Hinzugefügt werden 0,20 ml 0,01 M Magnesiumchlorid; 0,40 ml 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 9 und 0,20 ml Polynukleotidphosphorylase (Gewinnung unter Id). Diese Lösung wird in ein 2 ml fassendes Osswald-Viskosimeter gegeben und bei 37° C wie bei der Polymerisierung des nicht jodierten CDP beschrieben (Abschnitt Ie) inkubiert und weiter aufgearbeitet.

Ausbeute: 32 %; weiße, flockige Substanz.

Zur Charakterisierung von Poly Jod-C dient das UV-Spektrum (Abb. 3).

UV-Absorptionsdaten:

pH 2 : λ_{max} = 304 nm λ_{min} = 268 nm

pH 7: λ_{max} = 296 nm λ_{min} = 269 nm

III. DARSTELLUNG VON POLY-5-BROMCYTIDYLSÄURE

Als Ausgangssubstanz diente wiederum, wie bei der Jodierung, das Dinatriumsalz von 5'-Cytidinmonophosphat. Durch die höhere Reaktivität des Broms bedingt, mußte hier in wesentlichen Schritten anders als bei einer Jodierung vorgegangen werden. Die Darstellung erfolgte in teilweiser Anlehnung an MOFFAT und KHORANA (54).

a) Synthese von 5-Bromcytidinmonophosphat

700 mg Na2-CMP werden in zwei Portionen in je 15 ml Wasser gelöst, über den Ionenaustauscher Amberlite IRC 50 (Fa. Serva, Heidelberg) in die H'-Form (45 x 2 cm) gegeben und mit Wasser bis zur Neutralität nachgewaschen. Letzteres wird am Rotationsverdampfer abgezogen. Der klaren Masse werden 3 ml 0,2 M Salpetersäure und 6 ml Dioxan zugesetzt. Unter Rühren werden 0,12 ml Brom zugetropft, bis alles gut gelöst ist. Die Lösung wird drei Stunden im Dunkeln stehen gelassen. Anschließend wird abgezogen, mit 20 ml Äthanol trituriert und wieder abgezogen. Dieser Vorgang wird noch einmal wiederholt. Alkoholrückstände werden mit 15 ml Äther abgezogen.
Ein Reinigungsschritt mittels einer Säulen-

chromatographie über Dowex 1x2 (35 x 2 cm) in der Formiat-Form wird angeschlossen. Das Material wird in 10 ml Wasser gelöst und auf die Säule gegeben. Die Säule wird mit Wasser gewaschen, bis ein kleiner Peak bei einer Uvicord-Einstellung von 257 nm aufgetreten ist. Das auf der Säule befindliche Material wird mit einem linearen Gradienten von 500 ml Wasser und 500 ml 2 %iger Ameisensäure eluiert. Fraktionen von 10 ml werden gesammelt. In den Fraktionen Nr. 48 bis 97 erscheint das reine Brom-CMP. Die Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer abgezogen. Es wird nochmals in ca. 30 ml Wasser gelöst und wieder abgezogen.

Ausbeute: 68 %.

UV-Absorptionsdaten:

pH 2: λ_{max} = 299 nm λ_{min} = 257 nm

pH 7: λ_{max} = 286 nm λ_{min} = 265 nm

b) <u>Synthese von 5-Bromcytidinphosphat-morpholidat</u>

Eine OH-Gruppe des Phosphatrestes im Br-CMP muß nun durch eine organische Gruppe ersetzt werden, um im darauffolgenden Schritt diese Gruppe wiederum durch ein Phosphat zu substituieren. Hierzu wurde Morpholin benutzt. (Formelschema bei Abb. 4b).

330 mg Brom-CMP werden mit 15 ml Wasser und 15 ml tertiäres Butanol versetzt, sowie mit 0,8 ml Morpholin. Das Gemisch wird am Rückfluß zum Sieden gebracht. Während des Siedens wird langsam innerhalb von drei Stunden 1,2 g Dicyclohexylcarbodiimid gelöst in 20 ml tert. Butanol zugetropft. Dabei ist darauf zu achten, daß der pH der Lösung nicht unter 7,5 fällt, gegebenenfalls ist er mit wenig Morpholin wieder einzustellen. Es wird noch zwei weitere Stunden weitergekocht. Nach dem Erkalten wird abgezogen, bis eine gummiartige Masse zurückbleibt.

Das Morpholidat kann mittels einer Dünnschicht-Chromatographie auf MN-Polygram-Plättchen (Typ CEL 300 PEI/UV 254 der Firma Macherey-Nagel (Düren) nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von 0,05 M Natriumchlorid als Laufmittel bleibt Brom-CMP am Start, Morpholidat hat einen Rf-Wert von 0,65. Die Flecken werden unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht.

Dem Gummi werden 50 ml Wasser zugesetzt, gut gerührt und das nicht lösliche Dicyclohexyl-carbodiimid abgenutscht. Die restliche Trübung im Filtrat wird durch etwa viermaliges Ausschütteln mit je 15 ml Äther entfernt. Die klare Lösung

wird anschließend in einem warmen Wasserbad geschwenkt, um den gelösten Äther zu entfernen. Daraufhin wird das Wasser am Rotationsverdampfer abgezogen und die Substanz durch viermaliges Abziehen von wasserfreiem Pyridin getrocknet.

c) Synthese von 5-Bromcytidindiphosphat

Der Austausch der Morpholin-Gruppe am Br-CMP durch Phosphat wird mit Tri-n-butylammoniumphosphat in wasserfreiem Medium durchgeführt. In einem 50 ml fassenden Kolben werden 0,89 ml Tri-n-butylamin und 0,30 ml 85 %ige Phosphorsäure zusammengebracht. Durch mehrmaliges Abziehen von Pyridin wird wasserfrei gemacht. Das Phosphat wird in 10 ml Pyridin gelöst und mittels eines Verbindungsstückes in den Kolben übergeführt, in welchem sich das Br-CMP-Morpholidat befindet. Zum Reaktionsgemisch werden noch zweimal 10 ml Pyridin zugesetzt und abgezogen, um eine absolute Wasserfreiheit zu gewährleisten. Zuletzt wird in 15 ml Pyridin gelöst und eine Stunde geschüttelt. Der Ansatz wird im Dunkeln bei Raumtemperatur fünf volle Tage stehen gelassen.

Zum Ansatz werden 5 ml Wasser gegeben und am Rotationsverdampfer bei ca. 30° C abgezogen.

Noch zweimal werden 10 ml Wasser zugegeben und abgedampft, um Reste von Pyridin zu entfernen. Anschließend werden 300 mg Lithiumchlorid gelöst in 10 ml Wasser hinzugefügt. Es entsteht eine trübe Lösung. Es wird so lange mit je 10 ml Äther ausgeschüttelt, bis die Lösung klar ist. Gelöster Äther wird durch Schwenken in einem Wasserbad entfernt. Der Ansatz wird nun in einem Eisbad gekühlt und mit einer gesättigten Lithiumhydroxid-Lösung auf pH 12 gebracht. Dabei fällt das zu entfernende Lithiumphosphat langsam aus. Unter pH-Kontrolle wird das kalte Gemisch noch eine halbe Stunde gerührt und danach abgenutscht. Es wird mit 8 ml 0,01 M Lithiumhydroxid nachgewaschen.

Das Filtrat wird vorsichtig bei Rühren unter Zusatz des Ionenaustauschers Amberlite XE 64 (Fa. Serva, Heidelberg) in der H'-Form auf pH 8 eingestellt. Nach Abfiltrieren des Ionenaustauschers wird die Lösung bei ca. 30° C auf wenige ml eingeengt. Das Br-CDP wird durch Säulenchromatographie an Dowex 1 x 2 (30 x 1,5 cm) in der Chlorid-Form abgetrennt. Nach Aufgeben der Lösung wird mit 200 ml Wasser nachgewaschen. Daraufhin erfolgt eine lineare Gradientelution mit 500 ml 0,01 N Salzsäure und 500 ml 0,05 N Salzsäure

in welcher sich 0,2 M Lithiumchlorid befinden. Die eluierten Fraktionen werden mittels eines Uvicords bei 257 nm verfolgt und gesammelt.

Der vereinigte dritte Peak wird mit gesättigter Lithiumhydroxid-Lösung auf pH 4,5 - 5,5 eingestellt und am Rotationsverdampfer bei ca. 30° C abgezogen. Zum Rückstand werden 15 ml wasserfreies Methanol gegeben und eine halbe Stunde gerührt. Anschließend wird das Brom-CDP mit 70 ml Aceton ausgefällt. Der Niederschlag wird bei 5.000 Upm abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und über Nacht im Exsikkator über Silicagel getrocknet.

Ausbeute: 43 %; weißes Pulver.

Die Reinheit des Brom-CDP wird papier-electrophoretisch untersucht. Bei pH 3,5 (2,26 ml konz. Ameisensäure und 2 ml konz. Ammoniak auf 1 l Wasser aufgefüllt), einer Spannung von 55 V/cm (60mA) und 1 1/2 Std. Laufzeit läuft Brom-CDP anodisch 6 cm (CDP: 9 cm).

UV-Absorptionsdaten (siehe auch Abb. 5):

pH 2: λ_{max} = 285 nm λ_{min} = 250 nm

pH 7: λ_{max} = 288 nm λ_{min} = 263 nm

d) Polymerisation von 5-Bromcytidindiphosphat

40 mg Br-CDP werden in 1 ml Wasser und 1,6 ml 0,01 M Magnesiumchlorid gelöst. Dazu werden 1 ml 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8,4 und 0,3 ml Polynukleotidphosphorylase (Präparation unter Id) gegeben. Die Lösung wird bei 30° C inkubiert. Hier wurde auf die Verfolgung der Polymerisierung durch das Auftreten von anorganischem Phosphat zurückgegriffen. Dies beruht auf der Tatsache, daß bei jeder Anknüpfung einer Nukleotideinheit an eine wachsende Polynukleotidkette ein Phosphatrest aus einem gerade sich anheftenden Br-CDP-Moleküls abgespalten wird. Alle halbe Stunde wurde aus dem Inkubationsansatz eine Probe von 0,02 ml entnommen und der anorganische Phosphat quantitativ bestimmt. Die Menge dieses Anions nimmt graduell zu, bis ein Plateau erreicht wird, bei welchem die Polymerisation abgebrochen wurde. Zu den 0,02 ml Proben wird 1,98 ml Wasser und 0,2 ml 80 %ige Perchlorsäure pipettiert. Die Farbreaktion wird durch Zusetzen von 0,2 ml Amidol (0,5 g Diaminophenoldihydrochlorid und 10 g Natriumpersulfat, aufgefüllt auf 50 ml Wasser) und 0,1 ml 8,3 %igem Ammoniummolybdat erzielt. Die Blaufärbung wird nach 5 Minuten bei 650 nm photometrisch bestimmt.

Die Polymerisierung wird durch Zusatz von 2 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,4), in welchem sich 0,001 M Äthylendiamintetraacetat ("Titriplex III") befinden, abgebrochen. Um festzustellen, ob tatsächlich eine Polymerisation stattgefunden hat, und nicht eventuell die Enzymwirkung nur auf eine Phosphatabspaltung ohne Nukleotidknüpfung (Phosphomonoesterase-Wirkung) zurückzuführen wäre, wird eine Dünnschicht-Chromatographie angeschlossen. Eine Probe wird auf MN-Polygram-Plättchen (Typ CEL 300 PEI/UV 254) Firma Mecherey-Nagel (Düren) aufgetragen und aufsteigend mit 1 M Natriumchlorid chromatographiert. Nach Trocknung und Sichtbarmachung unter einer UV-Lampe kann festgestellt werden, daß Poly-Brom-C auf dem Startpunkt haften bleibt, dagegen Brom-CDP einen Rf-Wert von 0,25 erreicht und Brom-CMP einen Rf-Wert von 0,7.

Aus dem Reaktionsansatz wird durch mehrmaliges Ausschütteln mit Chloroform und anschließendes Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge das Protein entfernt. Die wässrige Phase wird einen Tag gegen 0,01 M Tris-HCl-Puffer pH 8, in welchem sich 0,001 M Äthylendiamintetraacetat befinden, dialysiert. Zuletzt wird zwei Tage gegen

dest. Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 20 %; weiße, flockige Substanz.

Zur Charakterisierung von Poly Brom-C dient das UV-Spektrum (Abb. Nr. 3).

UV-Absorptionsdaten:

pH 2: λ_{max} = 297 nm λ_{min} = 259 nm

pH 7: λ_{max} = 290 nm λ_{min} = 266 nm

IV. BROMIERUNG VON HEFE-RIBONUKLEINSÄURE

Für die Bromierung von Hefe-RNS wurde auf die Methodik von YU und ZAMECNIK (55) sowie DUVAL und EBBEL (56) im wesentlichen zurückgegriffen. 80 mg RNS aus Hefe (Fa. Boehringer u. Söhne, Mannheim) werden in 100 ml Wasser suspendiert und über Nacht im Kühlraum durch Rühren in Lösung gebracht. Anschließend wird erwärmt und dazu 100 ml einer leicht erwärmten 0,2 %igen wässrigen Lösung von Trimethyl-hexadecyl-ammoniumbromid gegeben. Der Ansatz wird einige Stunden bei 4° C gehalten. Das ausgefallene Material wird bei hoher Umdrehungszahl abzentrifugiert und nochmals mit Wasser gewaschen. Das Produkt wird über Nacht im Exsikkator getrocknet. Das Trimethylhexadecyl-Ammoniumsalz der RNS wird in 25 ml wasserfreiem Dimethylformamid auspendiert und über Nacht durch Rühren in Lösung gebracht. Zu der Lösung wird langsam 0,02 ml Brom in 1 ml Dimethylformamid unter Rühren dazugegeben. Im Anschluß werden 5 ml Dimethylformamid, welches mit Natriumbromid gesättigt ist, zugegeben. Bei Stehen in der Kälte fällt das Natriumsalz der bromierten Nukleinsäure aus. Es wird bei hoher Umdrehungszahl abzentrifugiert. Der Niederschlag wird noch zweimal mit einem Gemisch aus 0,1 M Natriumchlorid in Wasser

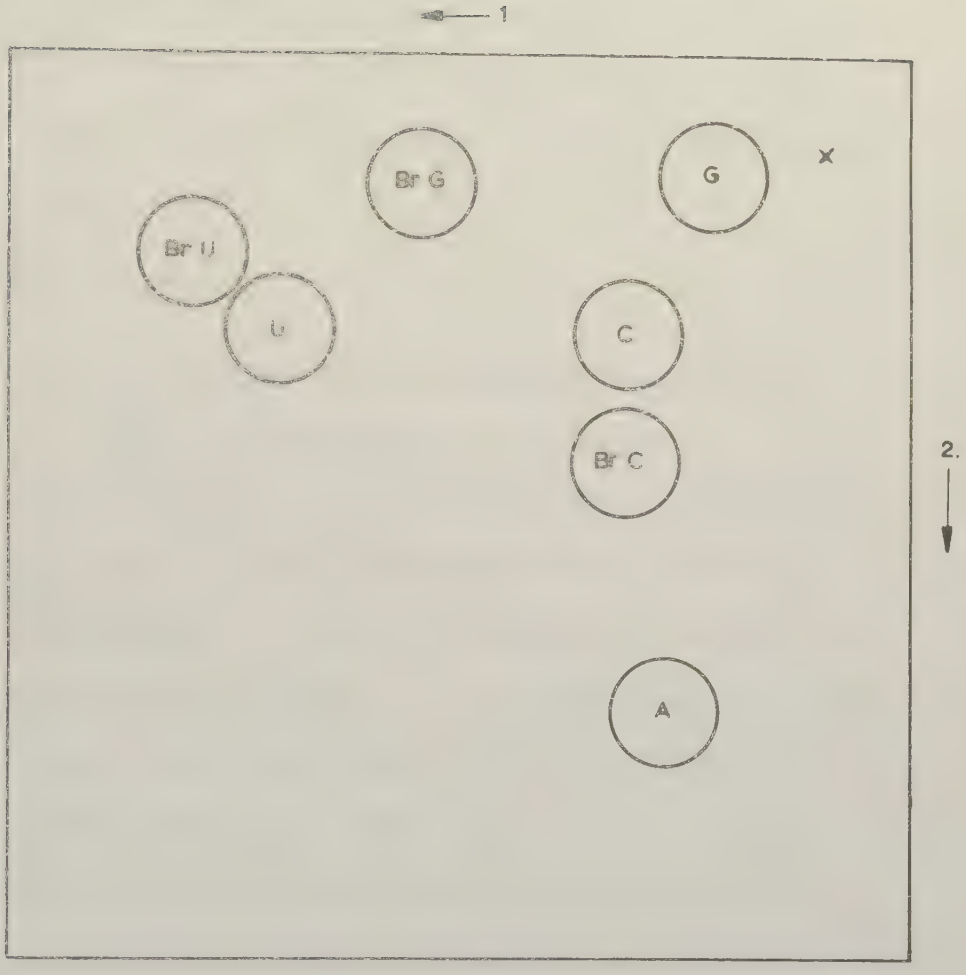


Abb.6:

Bidimensionale Papierchromatographie des Hydrolysats von bromierter Hefe-RNS

1.) Butanol, Isopropanol, HCl, Wasser
(6,5 : 6,5 : 7 : 7)

2.) Butanol, Ammoniak, Wasser
(12 : 1 : 1)

(Papier Schleicher u. Schüll Nr.2043 b)

und Äthanol (1 : 2) gewaschen und dann in einem großen Volumen Wasser gelöst, in welchem sich 0,001 M Natriumchlorid befinden. Es wird in der Kälte gegen Wasser zwei Tage dialysiert und zuletzt gefriergetrocknet.

Ausbeute: 38 %.

Um den Prozentsatz der bromierten Basen zu ermitteln, wird folgendermaßen vorgegangen: 1 mg der Substanz wird mit 0,2 ml 70 %iger Perchlorsäure versetzt und in einem verschlossenen Zentrifugenglas eine Stunde in einem kochenden Wasserbad gehalten. Danach wird mit 3 N Kaliumhydroxid neutralisiert und abzentrifugiert. Auf Chromatographiepapier Schleicher und Schüll Nr. 2043 b werden 0,05 ml des Hydrolysats aufgesetzt und jeweils 19 Std. zweidimensional absteigend chromatographiert. Das Elutionsmittel im ersten Fall ist ein Gemisch aus 32,5 ml Butanol, 32,5 ml Isopropanol, 35 ml konz. Salzsäure und 35 ml Wasser. Im zweiten Fall werden 90 ml Butanol, 7,5 ml konz. Ammoniak und 7,5 ml Wasser verwendet. Es ergeben sich bei Betrachtung im UV-Licht sieben Flecken (Abb. 6). Mit unbromierter RNS ergeben sich nur vier Flecken. Jeder Fleck auf dem Chromatographie-Papier wird ausgeschnitten, in kleine Streifen geschnitten, etliche Stunden in 0,01 M Salzsäure eluiert und

ein UV-Spektrum aufgenommen. Durch Vergleich mit den Spektren der vorher schon bekannten bromierten und nicht bromierten Basen (siehe unten) können jeweils die prozentualen Anteile in der bromierten RNS über die Umrechnung der molaren Extinktionen ermittelt werden.

Es folgt eine Tabelle der Prozentsätze der Basen in dieser bromierten RNS:

Adenin	20 %	------	8-Brom Adenin	0 %
Guanin	5 %	------	8-Brom Guanin	26 %
Cytosin	12 %	------	5-Brom-Cytosin	16 %
Uracil	4 %	------	5-Brom-Uracil	17 %

Die für die Umrechnung benutzten spektralen Daten sind folgende:

	Absorptionsmaximum	Molare Extinktion
Adenin	262 nm	13,1
Guanin	248 nm	11,4
Cytosin	280 nm	13,0
Uracil	260 nm	8,2
8-Brom-Guanin	270 nm	12,5
5-Brom-Cytosin	295 nm	8,2
5-Brom-Uracil	276 nm	8,2

Anschließend wurde eine Bestimmung auf Doppelsträngigkeit durchgeführt. Dabei wird davon ausgegangen, daß basengepaarte Stränge einer Nukleinsäure in wässriger Lösung durch Erhitzen auseinanderstreben. Durch ein schnelles Abkühlen kann dann verhindert werden, daß jene Stränge sich wieder zusammenpaaren. Bei einer photometrischen Messung der optischen Dichte einer Lösung wird infolgedessen bei Vorliegen von Doppelsträngen vor dem Erhitzen ein niedrigerer Wert abgelesen als nach dem Erhitzen. Die Messung wird im Bereich des ultravioletten Absorptionsmaximums von Nukleinsäuren bei 260 nm durchgeführt. Der durch Erhitzen verursachte Anstieg der Extinktion wird hyperchromer Effekt genannt.

Hier wurde einmal die nicht halogenierte RNS und zum anderen die bromierte Form soweit in einem 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,2, dem 0,15 M Natriumchlorid zugesetzt waren, verdünnt, bis die Extinktion jeweils 0,600, gemessen in einer 1-cm-Küvette, betrug. Daraufhin wurde die jeweilige Lösung in einem verschlossenen Reagenzglas während fünf Minuten in einem kochenden Wasserbad gehalten, dann in einem Eisbad abgekühlt und wieder die

Extinktion bestimmt. Bei der Hefe-RNS war der Wert um 9,5 % erhöht, was auf eine gewisse Doppelsträngigkeit schließen läßt. Bei der bromierten Form trat nur eine Erhöhung von 1,4 % ein. Dieser Wert kann als innerhalb der Fehlergrenze liegend angesehen werden.

V. GEWINNUNG EINER TIERISCHEN RIBONUKLEINSÄURE

a) Isolierung eines tierischen Ribonukleoproteins

Dazu wurde im gewissen Ausmaß auf ein von WILHEIM (57, 58, 59, 60, 61) im Jahre 1966 isoliertes Liponukleoprotein zurückgegriffen. Der Dünndarm eines jungen Rindes wird von anhaftendem Fett so gut wie möglich befreit, desgleichen auch von Verdauungssäften durch starkes Waschen unter dem Wasserhahn. Anschließend wird in kleine Stücke zerschnitten. Zu den nassen Stücken wird das gleiche Volumen dest. Wasser hinzugefügt und in der Kältekammer mit einem Ultraturrax homogenisiert. Bei Raumtemperatur

wird 3 Std. gerührt. Dann wird zweimal in einer Servall-Zentrifuge eine halbe Stunde bei 9.000 Upm abzentrifugiert und der Niederschlag sowie sich absetzendes Fett verworfen. Die Lösung wird im Wasserbad bis auf 80° C gebracht und wieder abgekühlt. Das ausgefallene Material wird abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 40 % festem Ammoniumsulfat (v/w) versetzt und über Nacht bei 4° C stehen gelassen. Das ausgefallene Material wird wieder abzentrifugiert. Der Überstand wird mit derselben Menge Äther zweimal ausgeschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Zu der Lösung wird 24 % festes Ammoniumsulfat (v/w) hinzugerührt und über Nacht bei 4° C stehen gelassen. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Ersterer wird 2 Tage im Kühlraum gegen dest. Wasser dialysiert und schließlich gefriergetrocknet.

Es folgt eine Reinigung über DEAE-Zellulose (Nr. 45050 der Fa. Serva, Heidelberg), welche mit einem 0,05 M Veronal-HCl-Puffer pH 7 equilibriert war. Die Rohsubstanz wird in Puffer gelöst (0,5 g in 10 ml), unlösliches Material eine halbe Stunde bei 17.000 Upm abzentrifugiert

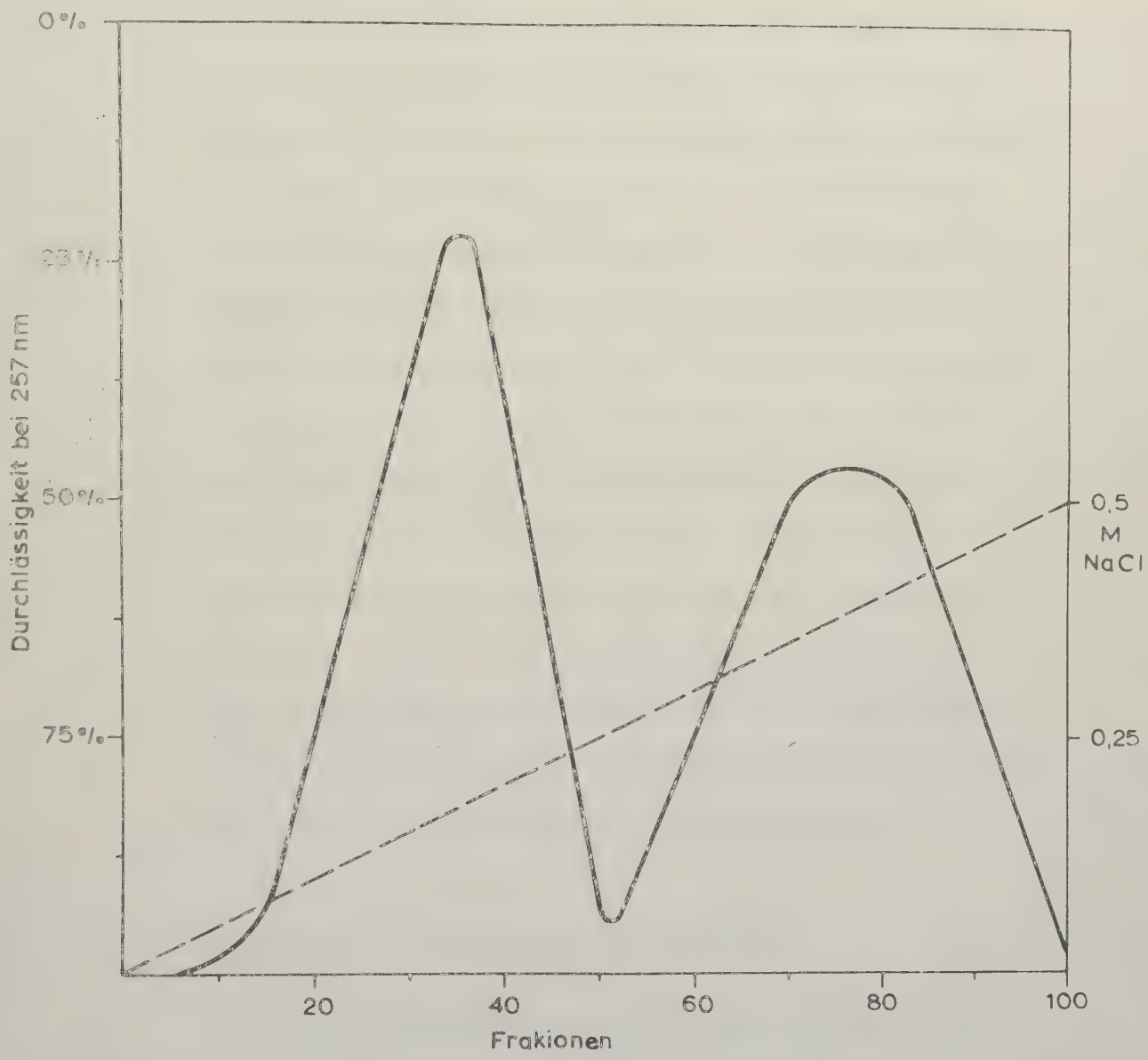


Abb.7:

Reinigung des tierischen Ribonukleoproteins über DEAE-Zellulose (1.Peak) mittels eines linearen NaCl-Gradienten (Veronal-Puffer pH 3).

und der Überstand auf die Säule gegeben (30x2cm). Es wird mit einem 0,05 M Veronal-HCl-Puffer pH 3 gewaschen, bis die UV-Absorption eines angeschlossenen Uvicord-Gerätes wieder auf die Ausgangsposition zurückgekehrt und der pH des Eluats auf pH 3 heruntergegangen ist. Dann wird ein linearer Gradient von 0 bis 0,5 M Natriumchlorid in total 400 ml Veronal-HCl-Puffer pH 3 angeschlossen (Abb. 7). Es erscheint ein größerer scharfer Fleck, welcher ein UV-Absorptionsmaximum bei 261 nm aufweist. Er wird gesammelt, dialysiert und gefriergetrocknet. Ein Folin-Test auf Protein (Abschnitt Ve) erbringt einen Anteil von 35 % Eiweiß. Ein Orcin-Test (Abschnitt Vf) ergibt 65 % Ribonukleinsäure.

b) Basenanalyse der Ribonukleinsäure

Die Basenanalyse wurde nach dem von KATZ und COMP (62) entwickelten Verfahren durchgeführt. 1 mg Substanz wird mit 0,2 ml 0,3 N Kaliumhydroxid versetzt und 24 Std. lang bei 37° C hydrolysiert. Dann wird mit 0,3 normaler Salzsäure neutralisiert und auf 5 ml mit Wasser aufgefüllt.

Zwei Dowex 1 x 2 - Säulen werden hintereinander an ein Uvicord-Gerät angeschlossen. Die obere Säule ist in der Chlorid-Form und besitzt die Ausmaße 8 x 0,8 cm. Die untere Säule ist in der Formiat-Form und besitzt die Ausmaße 5 x 0,8 cm. Vom RNS-Hydrolysat werden 1 ml aufgegeben. Die obere Säule wird mit 0,05 M Salzsäure gewaschen. Der auftretende Peak entspricht UMP. Die obere Säule wird dann mit dest. Wasser eluiert. Der erste Peak entspricht GMP. Der zweite Peak wird sofort auf die untere Säule geleitet. Beim Eluieren mit 0,0125 M Ameisensäure wird CMP heruntergewaschen, dann bei 0,8 M das AMP. Jeweils das halbe Volumen an gesammeltem Eluar für UMP und AMP wird mit verdünnter Natriumhydroxid-Lösung auf pH 7 eingestellt. Das halbe Volumen des GMP-Eluats wird mit verdünnter Salzsäure auf pH 2 eingestellt; desgleichen wird das GMP-Eluat halbiert.

Die Basenanalyse wird folgendermaßen ausgerechnet: Die bei λ_{max} gemessene Extinktion eines jeden Nukleotids wird mit dem gravimetrisch bestimmten Volumen multipliziert und durch den Extinktionskoeffizienten ε_{max} dividiert. Die Summe aller vier Quotienten wird gleich 100 %

gesetzt und danach der prozentuale Anteil jeder der Basen errechnet.

Hier wurden folgende Werte ermittelt:

Nukleotid	λ_{max}	ε_{max}	Prozentsatz
UMP	262 nm	9.600	21 %
GMP	257 nm	11.800	45 %
CMP	280 nm	13.000	24 %
AMP	257 nm	14.900	10 %

c) Auftrennung des Ribonukleoproteins

Eine DEAE-Zellulose-Säule (20 x 2,5 cm) wird mit einem 0,01 M Tris-Succinat-Puffer pH 7,6, in welchem 0,001 M Magnesiumacetat gelöst sind, äquilibriert. 500 mg Substanz wird in dem Puffer gelöst und auf die Säule gegeben. Eluiert wird mit einem Natriumchlorid-Gradienten desselben Puffers bis zu 1 M. Fraktionen von 5 ml werden gesammelt.

Es erscheinen zwei Peaks. Der erste enthält 96 % Proteinanteil und noch 4 % RNS (Folin- und Orcin-Bestimmung unter Abschnitt Ve und Vf), der zweite Peak enthält fast ausschließlich RNS.

Der Protein-Peak wird gesammelt, gegen dest. Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Der RNS-Anteil wird weiterhin durch mehrmaliges Ausschütteln mit Chloroform von dem kleinen Prozentsatz Protein befreit, dialysiert und gefriergetrocknet.

d) Charakterisierung der Ribonukleinsäure

0,5 mg der gereinigten und getrockneten RNS werden in 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 7, in welchem sich 0,15 M Natriumchlorid befinden, gelöst und in Analogie zu DELLWEG, GERNER und WACKER (63) über eine Sephadex-Säule (Typ G 200) von 70 x 2,2 cm gegeben. Die Molekularsiebsäule wurde mit demselben Puffer hergestellt. Nach dem Aufgeben der Lösung wird mit dem pH 7-Puffer mit einer Durchflußrate von 30 ml pro Stunde eluiert und Fraktionen von je 7 ml gesammelt. Die Fraktionen werden danach im Zeiss-Spektrophotometer PMQ 2 bei 260 nm ausgemessen. Dabei zeigt sich, daß ein großer Peak zwischen den Fraktionen Nr. 21 und Nr. 32 auftritt, der in etwa zwei Drittel der aufgegebenen Menge ausmacht. Ein zweiter Peak erscheint zwischen den Fraktionen Nr. 33 und Nr. 39, der das restliche

Drittel der RNS-Menge umfaßt. Bei einer vorhergehenden Eichung der Säule mit ribosomaler, Transfer- und niedermolekularer RNS aus Rattenhirn kann dem ersten zu determinierenden Peak etwa das Molekulargewicht von Transfer-RNS zugeschrieben werden, da dieser Peak zwischen den Fraktionen Nr. 21 und Nr. 32 auftritt. Dem zweiten Peak kann nur ein relativ geringes Molekulargewicht zugeschrieben werden, da nach der Elution an derselben Stelle ebenfalls die kleinen Nukleotide aus dem Rattenhirn auftraten, welche nach der Methode von DELLWEG et. al. gewonnen worden waren.

Der höher molekulare Peak wurde gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Eine kleine Menge wurde mit einem 0,02 M Tris-HCl-Puffer pH 7, welchem 0,15 M Natriumchlorid zugesetzt waren, so lange verdünnt, bis in einer 1-cm-Küvette im Zeiss-Spektrophotometer bei 260 nm nur noch eine Extinktion von 0,600 angezeigt wurde. Anschließend wurde die Lösung in ein Reagenzglas gefüllt, verschlossen und fünf Minuten in einem kochenden Wasserbad gehalten. Nach dieser Zeit wurde rasch in einem Eisbad abgekühlt und die Extinktion erneut ermittelt. Sie

lag nur um 2 % höher, was nicht als hyperchromer Effekt anzusehen ist.

e) Folin-Test auf Protein

Für die quantitative Bestimmung von Eiweiß wurde auf den entsprechenden Test von LOWRY et. al. (64) zurückgegriffen. Folgende wässrige Lösungen werden dazu benötigt:

A : 2 %iges Natriumcarbonat in 0,1 M Natriumhydroxid

B : 1 %iges Kupfersulfat ($CuSO_4 \times 5\ H_2O$)

C : 2 %iges Kaliumtartrat

D : 0,5 ml B und 0,5 ml C

E : 5 ml A und 0,1 ml D

F : Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz

Es werden 0,2 ml Probe mit 1 ml Lösung E zusammengebracht und 15 Minuten stehen gelassen. Nach dieser Zeit werden 0,1 ml Reagenz F hinzugegeben und sofort geschüttelt. Nach 30 Minuten wird die gebildete Blaufärbung photometrisch bei 740 nm in 0,5 cm-Küvetten bestimmt. Anhand einer entsprechenden Eichkurve, welche mit Rinderserum-Albumin aufgestellt wurde, kann die Probe quantitativ bestimmt werden.

f) Orcin-Test auf Ribonukleinsäure

Für die quantitative Bestimmung von RNS wurde auf die Farbreaktion zurückgegriffen, die Ribose mit Orcin beim Erhitzen in konz. Salzsäure eingeht. Die Bestimmung ist von SCHNEIDER (65) sowie OGUR und ROSEN (66) aufgestellt worden. Eine erste benötigte Lösung besteht aus 33 mg Eisenchlorid ($FeCl_3 \times 6\ H_2O$), welches in 100 ml konz. Salzsäure gelöst wurde. Vor jeder Bestimmung werden o,5 ml dieser Lösung in 100 mg Orcin gelöst. Zu 0,5 ml Probe werden 0,5 ml der frisch angesetzten Orcin-Lösung gegeben. Die Probe wird danach zwanzig Minuten in einem kochenden Wasserbad gehalten und dann mit 3 ml Wasser aufgefüllt. Die Intensität der grünen Farbe wird in 1-cm-Küvetten photometrisch bei 670 nm gemessen. Anhand einer Eichkurve kann der RNS-Gehalt der Probe festgestellt werden.

VI. DARSTELLUNG DER LÖSUNGEN FÜR DEN INTERFERON-TEST

Der beste bisher bekannte Interferon-Induktor ist das äquimolare Gemisch von Polyinosinsäure und Polycytidylsäure, ein synthetisches Präparat (FIELD et. al.) (32). In der vorliegenden Arbeit wurde eine 0,1 %ige Lösung von Poly I in 0,3 M Natriumchlorid mit einer 0,1 %igen Lösung von Poly C in 0,02 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,2 zusammengegeben. Unter diesen Umständen paaren sich beide einsträngigen RNS-Ketten zu einer Doppelhelix (Formelausschnitt Abb. 4c). DAVIES (67) hat unter ähnlichen Bedingungen für Poly I und Poly C mittels Röntgenstrukturanalyse eine Ähnlichkeit mit einem natürlichen RNS-Doppelstrang nachweisen können. Vergleicht man die UV-Spektren von Poly I und Poly C mit dem des Gemisches Poly I:C, wie auch weiterhin in derselben Weise die von den halogenierten Verbindungen, so stellt man einen hypochromen Effekt fest. Das heißt, die Extinktionen von Poly I:C oder der anderen Gemische sind geringer als die Summe der diesbezüglichen Einzelextinktionen. Dieser hypochrome Effekt ist nach FELSENFELD und RICH (68) sowie DAVIES und RICH (69) auch ein Maß für die Doppelsträngigkeit. Der Prozentsatz schwankt je nach dem verwendeten Puffer und der Qualität der Polynukleotidpräparation.

Um hier die hypochromen Effekte für Poly I:C, Poly I : Brom-C und Poly I : Jod-C zu ermitteln, wurde folgendermaßen vorgegangen:
Von den einzelnen einsträngigen synthetischen Nukleinsäuren wurden 0,1 %ige Lösungen in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,2, der 0,15 M an Natriumchlorid war, angesetzt und jeweils 0,1 ml mit Puffer auf 4 ml aufgefüllt. In derselben Art wurden Lösungen von den diesbezüglichen Polynukleotidmischungen hergestellt. Von allen Lösungen wurde jeweils in 1-cm-Küvetten ein UV-Spektrum aufgenommen. Dabei zeigte sich, daß bei den jeweiligen Mischungen ein Absorptionsmaximum bei 245 nm auftrat. Dieses Maximum lag beträchtlich niedriger als die Summe der bei derselben Wellenlänge gemessenen Extinktionen der Einzellösungen.

Die ermittelten hypochromen Effekte erbrachten folgende Prozentsätze:

Poly I : C	27 %
Poly I : Jod-C	21 %
Poly I : Brom-C	19 %

Im Interferon-Test wurden von Poly I:C nur 10 Mikrogramm/ml eingesetzt, da diese Konzentration ausreichend war, um eine optimale Induktion hervorzurufen (FIELD et. al.) (32).
Von Poly I : Brom-C und Poly I : Jod-C wurden jeweils 100 Mikrogramm/ml eingesetzt. Von der Hefe-RNS, ihrer bromierten Form sowie der tierischen RNS wurden je 1 mg in 1 ml desselben Puffers gelöst, wie er für die synthetischen Nukleinsäuren zur Anwendung kam. Im Test wurden je 100 Mikrogramm/ml von den Substanzen eingesetzt.

C. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die im Interferon-Test eingesetzten Substanzen erbrachten folgende Induktionsresultate:

	Dosis		Titer
Kontrolle	0	Mikrogramm/ml	-3
Poly I:C	10	"	64
Poly I:Jod-C	100	"	12
Poly I:Brom-C	100	"	20
Hefe-RNS	100	"	16
Bromierte Hefe-RNS	100	"	-4
Tierische RNS	100	"	+4

Bei der Betrachtung der erzielten Titerwerte für Poly I : Jod-C und Poly I : Brom-C im Gegensatz zu Poly I:C fällt der große quantitative Unterschied auf. Worauf diese geringere Wirksamkeit der halogenierten Polycytidylsäuren zurückzuführen ist, die übrigens inzwischen auch von COLBY und CHAMBERLIN (70) für die bromierte Verbindung festgestellt wurde, ist bisher nicht bekannt. Die eben erwähnten Autoren enthalten sich dabei jeglicher Diskussionsmöglichkeit. Der Unterschied zwischen den beiden

halogenierten Polycytidylsäuren liegt außerhalb der Fehlergrenze des Tests und ließe sich möglicherweise in der Richtung deuten, daß mit zunehmender Größe des Halogensubstituenten in 5-Stellung die Wirksamkeit des entsprechenden Polycytidylsäureanalogen als Interferoninduktor in Mischung mit Poly I abnimmt.

Spekulationen über die Ursache der Unterschiede zwischen den Titerwerten von Poly C und ihren halogenierten Formen sind gewagt, da die Frage nach dem Mechanismus der Interferon-Induktion, vor allen Dingen nach dem Wirkungsort der Induktion noch ungeklärt sind. Zwei Möglichkeiten - Zelloberfläche oder Zellinneres - stehen sich hier gegenüber. SCHELL (36) hat postuliert, daß ein Induktor sich nur an der Zellwand der zu induzierenden Zelle anzulagern braucht, um den Mechanismus auszulösen. Sollte diese Vorstellung den Tatsachen entsprechen, so könnte man annehmen, daß gerade nur doppelsträngige Ribonukleinsäuren induzieren, weil sie in dieser Form dem Angriff von extracellulären Ribonukleasen geschützt wären. Nach den in der vorliegenden Arbeit ermittelten hyperchromen Effekten von 27 % für Poly I:C und jeweils von 21 % und 19 % für Poly I : Jod-C und Poly I : Brom-C scheint außer Zweifel zu stehen, daß diese Präparate in

der eingesetzten Form zumindest teilweise doppelsträngig sind. Die Basenpaarung müßte nach dem in Abb. gezeigten Schema zustande kommen.

Andererseits gibt es Autoren, welche nach ihren Untersuchungen auch bei einsträngigen Ribonukleinsäuren eine Interferon-Wirksamkeit aufzeigen konnten. So schreiben de CLERCQ und MERIGAN (71) in ihren Versuchen folgenden Einzelsträngen eine entsprechende Wirkung zu, sofern sie in höheren Dosen eingesetzt wurden: Polyinosinsäure, Polyguanylsäure und Polyxanthosinsäure.
Sie meinen, daß dies Differenzen in dem Mechanismus der antiviralen Aktivität von Einzel- und Doppel-Helices widerspiegeln könnte.
Zu ähnlich positiven Resultaten in bezug auf die Wirksamkeit von Einzelsträngen kommen BUCKLER et. al. (72). Sie setzen Poly I und Poly C getrennt als Induktoren ein, mischen jedoch den Lösungen polybasische Substanzen wie Neomycin oder Streptomycin bei. Sie interpretieren ihre positiven Ergebnisse mit diesen Induktoren so, daß die Polykationen sich an die polyanionischen Nukleotidstränge anlagern würden. Auf diese Weise würde Poly I oder Poly C gegen den Angriff von extracellulären

Ribonukleasen resistent werden und weiterhin würde - wie sie meinen - die zelluläre Aufnahme jener beschleunigt werden. LAMPSON et. al. (73) haben diese Resultate eingehendst überprüft. Sie konnten im Kaninchen keine Induktion mittels Zugabe von Neomycin zu Poly I oder Poly C allein erzielen. Weiterhin konnte in vitro Neomycin das Poly C nicht vor der degradierenden Ribonukleasewirkung schützen. Sofern die Untersuchenden sogar Neomycin zu Poly I:C dazugaben, erzielten sie in Nierenzellen des Kaninchens eher eine Hemmwirkung anstatt der von BUCKLER et. al. postulierten Verstärkung des Induktionsvorganges. LAMPSON et. al. (73) kommen zu dem Schluß, daß die Induktionskapazität von Poly I:C gegenüber den diesbezüglichen Einzelsträngen um die Relation 1:1000 höher liegen müßte.

Von einer anderen Relation zwischen dem quantitativen Interferoneffekt, ausgelöst durch Poly I:C oder Poly I und Poly C allein berichten BARON et. al. (74). Nach ihren Untersuchungen, worin sie diese einzel- oder doppelsträngigen RNS-Formen in verschiedenen Zellsystemen testen, gelangen die Autoren zu folgender Postulierung: Es scheint möglich, daß alle RNS-Arten induzieren können. Jedoch würde je

nach der größeren Stabilität von doppelsträngigen Formen gegenüber der Abbauwirkung von Ribonukleasen diese eine jeweils größere Möglichkeit besitzen, um den entsprechenden Zellwirkort intakt zu erreichen. Dies wird innerhalb der Veröffentlichung von BARON et. al. dadurch bekräftigt, daß sie eine hohe Virushemmrate beim Einsatz von genügend hohen Dosen an Poly I oder Poly C, nämlich je 300 Mikrogramm/ml erreichen. Sofern sie von Poly C nur 30 Mikrogramm/ml einsetzten, war die Hemmrate ca. um die Zehnerpotenz zwei gegenüber der erstgenannten Dosis herabgesetzt. Sofern sie 30 Mikrogramm/ml Poly I einsetzten, erhielten sie in zwei von ihnen benutzten Interferonsystemen eine der Wirkung von 300 Mikrogramm/ml quantitativ ziemlich ähnliche Virushemmung. Im dritten untersuchten System war allerdings auch hier ein Effektabfall bei der Dosis 30 gegenüber der von 300 zu beobachten. Ähnlich wie in vorliegender Arbeit konnten BARON et. al. aber den quantitativ höchsten Interferoneffekt schon mit 10 Mikrogramm/ml Poly I:C auslösen, wozu sie bei den Einzelsträngen sonst die Dosis 300 benötigten. WACKER et. al. (75) haben in einer interessanten Arbeit untersucht, inwieweit bei Dosen von jeweils 50 Mikrogramm/ml die Kettenlänge von Oligocytidylsäure, mit Poly I hybridisiert, und

andererseits die von Oligoinosinsäure mit Poly C ausschlaggebend ist, um einen relativ guten Interferon-Titer (32) zu erreichen. Dabei zeigte sich, daß im ersten Fall bei Oligo C mindestens eine Kettenlänge von 31 Nukleotiden erforderlich war. Oligo I mußte, um denselben Titer zu erreichen, eine Länge von mindestens 26 Nukleotiden aufweisen. Erst 50 Mikrogramm/ml Oligo von der Kettenlänge 39 mit Poly C hybridisiert, erreichten den hohen Interferon-Titer von 64, wie ihn 10 Mikrogramm/ml Poly I:C auszulösen vermag.

Einen Beitrag zum Problem der Erfordernis von Doppelhelices haben zuletzt LODEMANN et. al. (76) geliefert. Sie untersuchten den Zusammenhang zwischen Induktionswirkung und den Schmelzpunkten der diesbezüglichen Substanzen und zeigten, daß induzierende RNS-Doppelhelices in Lösung einen Schmelzpunkt (T_m) haben müssen, der höher als bei 40° C liegt. Dies wird so interpretiert, daß, um in vivo oder in vitro Interferon zu induzieren, die Bedingung T_m > Versuchstemperatur erfüllt sein muß.

Die Doppelsträngigkeit allein ist für die Induktion und ihr Ausmaß, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, jedoch nicht die einzige Bedingung

zur Interferon-Ausschüttung. Eine weitere Bedingung ist offensichtlich die Erfordernis nach Ribose-haltigen Ketten, was hier erfüllt ist. Diese Bedingung wird jedoch durch die Veröffentlichung von VILCEK et. al. (77) insofern eingeschränkt, als diese Autoren auch mit dem Hybridenpaar Poly I mit Desoxyribopolycytidylsäure eine Induktion hervorrufen konnten, jedoch nicht, wenn beide Stränge in Desoxy-Form waren. Danach könnte man, um zu einem Bezug zu den hier diskutierten Resultaten zu gelangen, annehmen, daß bei einem äquimolaren Gemisch eines Hypoxanthin-haltigen Polynukleotids und eines Cytosin-haltigen mehr die Struktur Inosin von Wichtigkeit wäre als die des Cytidins.

Was den primären Wirkort der Induktion anbelangt, so gibt es neben der Möglichkeit der strukturellen Abschirmung der Induktoren gegen extracelluläre Nukleasen die andere diametral entgegengesetzte Auffassung. Sie beruht auf der Annahme, daß zur Interferon-Induktion zumindest ein gewisser kleiner Prozentsatz eines Induktors aus dem Medium in die Wirkzelle hineingelangen müßte (BAUSEK und MERIGAN) (37). Dort könnte der Induktor am Zellgenom ein Protein derepressieren und somit könnte die Zelle nun das Interferon produzieren.

Welche der beiden Möglichkeiten, Induktion an der Zelloberfläche oder im Zellinneren, die richtige ist, muß sich erst herausstellen.

Im Lichte all dieser Erkenntnisse läßt sich die Induktionswirkung der in dieser vorliegenden Arbeit verwendeten Hefe-RNS (Titer 16) sowie die Unwirksamkeit ihrer bromierten Form diskutieren. Das Problem dürfte sich auf das wenigstens partielle Vorliegen von Doppelsträngen reduzieren. Bei der Gewinnung von RNS aus den Hefezellen ist die isolierte RNS zum größten Teil ribosomalen Ursprungs. Da ein erheblicher Teil der ribosomalen RNS doppelsträngig ist, ist auch bei wenig schonender Aufarbeitung ein Teil des Präparats basengepaart, wie der hyperchrome Effekt von 10 % zeigt. Die Ursache für die im Verhältnis zu Poly I:C geringere Wirksamkeit der Hefe-RNS könnte in der geringen Doppelsträngigkeit zu suchen sein. Die Unwirksamkeit der bromierten Form kann so verstanden werden, daß bei der Halogenierung die Basenpaarung weitgehend verloren gegangen ist. Es konnte ein hyperchromer Effekt nachgewiesen werden. Es könnte aber auch die Einführung des Halogens - ähnlich wie bei Poly I:C - für die durch Bromierung verursachte Abnahme der Induktionswirkung der Hefe-RNS verantwortlich sein. Im Gegensatz dazu konnten

EBEL et. al. (78) eine Hemmung der Vermehrung des Myxovirus parainfluenzae durch Zugabe einer bromierten RNS tierischen Ursprungs erreichen. Diese RNS war unter sehr milden Bedingungen an den Guanin-Resten bromiert. Sofern 10 % der Guanin-Basen in Stellung 8 halogeniert waren, wurde eine 13 %ige Virushemmung erzielt. Waren 3 % der Guanin-Reste bromiert, betrug die Hemmung 23 %.

Der sehr geringe Interferoneffekt der hier isolierten RNS aus dem tierischen Nukleoprotein mag zuerst erstaunend erscheinen. Nach dem praktischen Nichtvorhandensein eines hyperchromen Effekts könnte jedoch hierin eine Erklärung liegen.

Abschließend betrachtet will es scheinen, daß noch lange und intensive Bemühungen erforderlich sind, um eine klare Grundlage für das Verständnis des komplexen Vorganges der Interferon-Induktion zu legen. Es könnte sein, daß eines Tages erst ein umfassenderes Wissen über die Tertiärstruktur von Ribonukleinsäuren einen biochemischen Vorgang, wie es der hier untersuchte ist, aufhellen hilft.

D. ZUSAMMENFASSUNG

1.) Es wurde über die Darstellung der synthetischen Ribonukleinsäuren Polycytidylsäuren, Poly-5-Jodcytidylsäure sowie Poly-5-Bromcytidylsäure, ausgehend von 5'-Cytidinmonophosphat, berichtet. Die Substanzen wurden im äquimolaren Verhältnis mit Polyinosinsäure hybridisiert. Bei Austestung dieser Kombinationen auf ihre Interferon induzierenden Eigenschaften wurde eine von Poly C über Poly Brom-C bis Poly Jod-C gehende abnehmende Wirksamkeit ermittelt.

2.) Eine Ribonukleinsäure aus Hefe wurde bromiert, diese Form charakterisiert und die behandelte wie die unbehandelte Form in der Interferon-Induktion ausgetestet. Nur die nicht bromierte Form war induzierend.

3.) Es wurde ein tierisches Ribonukleoprotein gewonnen und in die Eiweiß- und Nukleinsäure-Komponente zerlegt. Letztere wurde charakterisiert und auf Interferon-Induktion getestet, sie war praktisch unwirksam.

4.) Die Ergebnisse wurden anhand der vorliegenden Literatur diskutiert.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1.) A. Isaacs und J. Lindenmann: Proc. Roy.Soc. Ser. B 147 (1957), 258

2.) J. Lindenmann, D.C. Burke und A. Isaacs: Brit. J. Exptl. Pathol. 38 (1957), 551

3.) T. Haneishi, M. Shirasaki, H. Okazaki, Y. Nagano und Y. Kojima: Compt. Rend. Soc. Biel. 158 (1964), 1433

4.) Y. Nagano: Japan. J. Exptl. Med. 35 (1965), 21 P.

5.) Y. Nagano, Y. Kojima, M. Shirasaki und T. Haneishi: Japan. J. Exptl. Med. 35 (1965), 133

6.) J. Vilcek: Nature 187 (1960), 73

7.) G.E. Sather und W.Mcd. Hammon: Fed. Proc. 22 (1963), 557

8.) P.D. Parkman, E.L. Buescher und M.S. Artenstein: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 111 (1962), 225

9.) M. Ho und J.F. Enders: Virol. 9 (1959), 446

10.) H. Heineberg, E. Gold und F.C. Robbins: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 115 (1964), 947

11.) M.J. Fruitstone, G.H. Waddell und M.M. Sigel: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 117 (1964), 804

12.) N. Khoobyarian: J. Bacteriol. 87 (1964), 24

13.) J. Kazar: Acta Virol. 10 (1966), 277

14.) L. Borecky: Proc. Symp. Med. Appl. Virol. Fort Lauderdale, Florida, 1966

15.) W.R. Stinebring und J.S. Joungner: Nature 204 (1964), 712

16.) B. Lukas und J. Hruskova: Folia Microbiol. 12 (1967), 157

17.) M.W. Rytel und T.C. Jones: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 123 (1966), 859

18.) W.R. Stinebring und J.S.Joungner: Abstr. Proc. Interferon Conf. Nat. Inst. Health 1965

19.) I. Gresser: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 108 (1961), 799

20.) T.C. Johnson und L.C. Mac Laren: J. Bacteriol. 90 (1965), 565

21.) E.W. Hook und R.R. Wagner: J. Immunol. 83 (1959), 310

22.) J.S. Joungner u. W.R. Stinebring: Nature 208 (1965), 456

23.) H.M. Powell, C.G. Culbertson, J.M. Mac Guire, M.M. Hoehn und L.A. Baker: Antibiot. Chemotherapy 2 (1952), 432

24.) W.J. Kleinschmidt und G.W. Probst: Antibiot. Chemotherapy 12 (1962), 298

25.) L.F. Ellis und W.J. Kleinschmidt: Nature 215 (1967), 649

26.) R.E. Shope: J. Exptl. Med. 97 (1953) 601

27.) R.E. Shope: J. Exptl. Med. 123 (1966), 213

28.) U.J. Lewis, E.L. Rickes, D.E. Williams, L. Mac Clelland u. N.G. Brink: J. Am Chem. Soc. 82 (1960), 5178

29.) G.T. Banks, K.W. Buck, E.B. Chain, F. Himmelweit, J.E. Marks, J.M. Tyler, M. Hollings, F.T. Last und O.M. Stone: Nature 218 (1968), 542

30.) Z. Rotem, R.A. Cox und A. Isaacs: Nature 197 (1963), 564

31.) P. Louisot, L. Colobert, C. Bollack, J.H. Weil und J.P. Ebel: Biochim. Biophys. Acta 155 (1968), 38

32.) A.K. Field, G.P. Lampson, A.A. Tytel, M.M. Nemes und M.R. Hilleman: Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 58 (1967), 2102

33.) G.P. Lampson, A.A. Tytel, A.K. Field, M.M. Nemes und M.R. Hilleman: Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 58 (1967), 782

34.) A.K. Field, A.A. Tytel, G.P. Lampson und M.R. Hilleman: Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 58 (1967), 1004

35.) A.A. Tytel, G.P. Lampson, A.K. Field und M.R. Hilleman: Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 58 (1967), 1719

36.) P.L. Schell: Z. Naturforschg. 23b (1968), 1117

37.) G.H. Bausek und T.C. Merigan: Virol. 39 (1969), 491

38.) E. Heller: Virol. 21 (1963), 652

39.) R.R. Wagner und A.S. Huang: Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 54 (1965), 1112

40.) W.A. Carter und H.B. Levy: Science 155 (1967), 1254

41.) P.I. Marcus und J.M. Salb: Virol. 30 (1966), 502

42.) J. Taylor: Biochem. Biophys. Res. Commun. 14 (1964), 447

43.) R.M. Friedman und J.A. Sonnabend: Nature 203 (1964), 366

44.) W.K. Joklik und Y. Becker: J. Mol. Biol. 13 (1965), 496 und 511

45.) W.K. Joklik und T.C. Merigan: Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 56 (1966), 558

46.) N.B. Finter: Interferons, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1966

47.) M. Ho und J.F. Enders: Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 45 (1959), 385

48.) R.F. Sellers und M. Fitzpatrick: Brit. J. Expt. Pathol. 43 (1962), 674

49.) L. Borecky und V. Lackovic: Acta Virol. 8 (1964), 200

50.) A.M. Michelson: Biochim. Biophys. Acta 91 (1964), 1

51.) R. Lettres und A.M. Michelson: Bull. Soc. Chim. Biol. 45 (1963), 1353

52.) R.F. Steiner und R.F. Beers: Polynucleotides, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1961

53.) R.A. Harvey, C.S. Mac Caughlin u. M. Grünberg-Manago: Eur. J. Biochem. 9 (1969), 50

54.) J.G. Moffat und H.G. Khorana: J. Am. Chem. Soc. 83 (1961), 649

55.) C. Yu und P. Zamecnik: Biochim. Biophys. Acta 72 (1963), 217

56.) J. Duval und J.P. Ebel: Bull. Soc. Chim. Biol. 47 (1965), 787

57.) G. Wilhelm: Z. Naturforschg. 21b (1966), 793

58.) G. Wilhelm: Z. Naturforschg. 21b (1966), 797

59.) G. Wilhelm: Z. Naturforschg. 21b (1966), 848

60.) G. Wilhelm: Z.Naturforschg. 21b (1966), 850

61.) G. Wilhelm: Z. Naturforschg. 21b (1966), 852

62.) S. Katz und D.G. Comb: J. Biol. Chem. 238 (1963), 3065

63.) H. Dellweg, R. Gerner und A. Wacker: J. Neurochem. 15 (1968), 1109

64.) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall: J. Biol. Chem. 193 (1951), 265

65.) W.C. Schneider: J. Biol. Chem. 161 (1945), 293

66.) M. Ogur und G. Rosen: Arch. Biochem. 25 (1950), 262

67.) D.R. Davies: Nature 186 (1960), 1030

68.) G. Felsenfeld und A. Rich : Biochem. Biophys. Acta 26 (1957), 457

69.) D.R. Davies und A. Rich: J. Am. Chem. Soc. 80 (1958), 1003

70.) C. Colby und M.J. Chamberlin: Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 63 (1969), 160

71.) E. de Clercq und T.C. Merigan: Nature 222 (1969), 1148

72.) C.E. Buckler, A. Billiau, F. Dianzani, C. Uhlendorf und S. Baron: Fed. Proc. 28 (1969), 503

73.) G.P. Lampson, A.A. Tytel, A.K. Field, M.M. Nemes und M.R. Hilleman: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 132 (1969), 212

74.) S. Baron, N.N. Bogomolova, A. Billiau, H.B. Levy, C.E. Buckler, R. Stern und R. Naylor: Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 64 (1969), 67

75.) A. Wacker, A. Singh, J. Svec und E. Lodemann: Naturwiss. 56 (1969), 638

76.) E. Lodemann, A. Singh, J. Svec, K. Mohrbutter, U. Lauschke und A. Wacker: Vorgetragen a.d. Wintertagung d. Gesellschaft f. Biol. Chem., Würzburg, Febr. 1970

77.) J. Vilcek, M.H. Ng, A.E.Friedman-Kien u. T. Kravciw: J. Virol. 2 (1968), 648

78.) J.P. Ebel, J.H. Weil, G. Beck, C. Bollack, L. Colobert und P. Louisot: Biochem. Biophys. Res. Commun. 30 (1968), 148

Vorliegende Dissertation wurde im Institut für Therapeutische Biochemie an der Universität Frankfurt am Main unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Adolf Wacker angefertigt.

Meinem verehrten Lehrmeister, Herrn Prof. Dr. Adolf Wacker, möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und für die weitgehende Unterstützung und Anregung bei der Arbeit meinen zutiefst empfundenen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Hugo Fasold möchte ich für das stete Interesse danken, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Herr Dr. Edgar Lodemann hat mir in seiner Eigenschaft als Akademischer Rat seine große Erfahrung sowie seine hervorragende wissenschaftliche Begabung uneingeschränkt zuteil werden lassen. Hierfür meinen allerherzlichen Dank.

Für die Einführung in neue biochemische Methoden und Techniken möchte ich Herrn Dr. habil. L. Träger, Herrn Dr. P. Chandra sowie Frau I. Niedenthal meinen Dank aussprechen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren Becker, Degenhardt, Fasold, Pfleiderer, Pietsch, Schneider, Rajewski, Wacker, Wieland und Winnacker, sowie Herr Dozent Träger.